

Aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Interaktionen der Proteinkinase CK2 mit den
Transkriptionsfaktoren
der USF-Familie in den β -Zellen des Pankreas**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2016

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Sarah Spohrer, geborene Lupp
geb. am 09.05.1988 in Homburg/Saar

Abkürzungsverzeichnis

λ	Absorption
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
b	basisch
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
C/EBP δ	„CAAT/Enhancer-bindendes Protein Delta“
Ci	Curie
CK2	Proteinkinase CK2
CMV	Cytomegalovirus
cpm	„counts per minute“ (Zählimpulse pro Minute)
C-Terminus	Carboxyterminus
CX-4945	Silmitasertib
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
deion.	deionisiert
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Desoxycholat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
HLH	„Helix-Loop-Helix“
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KE	Zellkernextrakt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Luc	Luciferase
LZ / LZip	Leucin-Zipper
μ	micro
m	milli
M	molar
max	maximal
mg	Milligramm
mM	Millimol
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-RNA)
mut	Mutante
n	nano
NLS	Zellkernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PBS	„phosphate buffered saline“
PCA	p-Cumarsäure

Abkürzungsverzeichnis

PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
PD	„pull-down“
PDX-1 (STF1)	„Pancreatic Duodenal Homeobox-1“
PK	Proteinkinase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
PLA	"Proximity Ligation Assay"
Poly-A	Polyadenylierung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QC	Qualitätskontrolle
Q	Quinalizarin: 1,2,5,8-tetrahydroxyanthraquinon
rel.	relativ
rH	relative humidity
RNA	Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sepharosekontrolle
T	Threonin
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TBS	„tris buffered saline“
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
USF	„upstream stimulatory transcription factor“
USR	USF-spezifische Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Vorpräzipitat
Wt	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis

z.B.	Zum Beispiel
ZE	Zellextrakt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary	3
3. Einleitung	4
3.1 Die Transkriptionsfaktoren der USF-Familie - Struktur und Funktion.....	4
3.2 Die Proteinkinase CK2	7
3.3 Rolle der USF-Proteine und CK2 im Kohlenhydratstoffwechsel	8
3.4 Das Pankreas und die Glucose-stimulierte Insulinsekretion	10
3.5 Rolle der USF-Proteine und CK2 bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion	11
3.6 Zielsetzung der Arbeit	12
4. Materialien	15
4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme.....	15
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
4.1.2 Chemikalien	17
4.1.3 Radiochemikalien	19
4.1.4 Enzyme	19
4.1.5 Experimentelle Kits.....	19
4.2 Nährmedien für Bakterien	19
4.3 Molekulargewichtsmarker.....	20
4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker	20
4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	20
4.4 Antikörper	20
4.4.1 Primärantikörper.....	20
4.4.2 Sekundärantikörper	22
4.5 Bakterienstämme	22
4.6 Zelllinie	23
4.7 Primer	23
4.8 Plasmide	23
4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine.....	24
4.10 Puffer und Lösungen	24
4.11 Computerprogramme	33

5. Methoden.....	34
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion	34
5.1.2 Herstellung von Agarosegelen	35
5.1.3 Agarosegelelektrophorese	35
5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	36
5.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
5.1.6 DNA-Sequenzierung	37
5.1.7 Statistische Analysen.....	37
5.1.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	37
5.1.9 Herstellung von Agar-Selektionsplatten	38
5.1.10 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Nucleobond® AX-plasmid- purification kit	38
5.2 Zellkulturtechniken	39
5.2.1 Kultivieren von Zellen	39
5.2.2 Passagieren von Zellen.....	39
5.2.3 Tauen von Zellen.....	39
5.2.4 Einfrieren von Zellen.....	39
5.2.5 Ernten von Zellen	40
5.2.6 Beseitigung von Kontaminationen	40
5.2.7 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer.....	40
5.2.8 Transiente Transfektion von Zellen	41
5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden	42
5.3.1 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	42
5.3.2 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse	42
5.3.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	42
5.3.2.2 Herstellung von Zellkern- und Cytoplasmaextrakten	42
5.3.3 Herstellung von Extrakten aus Gewebestücken	43
5.3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Gewebestücken.....	43
5.3.3.2 Herstellung von Zellkern- und Cytoplasmaextrakten aus Gewebestücken.....	43
5.3.4 Proteinquantifikation nach Bradford	43
5.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
5.3.6 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	45
5.3.7 Western Blot Analyse.....	46

5.3.8 Immunologischer Proteinnachweis	46
5.3.9 Coimmunpräzipitation.....	47
5.3.10 <i>In vitro</i> -CK2-Kinaseassay	48
5.3.11 Phosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen.....	49
5.3.12 <i>In vivo</i> -Phosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen	49
5.3.13 Autoradiographie.....	50
5.3.14 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	50
5.3.15 „Proximity Ligation Assay“ (PLA).....	51
5.3.16 Luciferase-Assay	52
5.3.17 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	53
5.3.18 Streptavidin-basierende Affinitätsreinigung (DNA pull-down)	54
5.3.19 Sucroседichtegradienten-Zentrifugation	55
5.3.20 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	56
6. Ergebnisse	57
6.1 Charakterisierung der Interaktion der USF-Proteine und CK2 in INS-1-Zellen und im Pankreasgewebe	58
6.2 Analyse einer USF1-Phosphorylierung durch die CK2 in INS-1-Zellen.....	69
6.3 Analyse eines Einflusses der USF1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Funktionen der USF-Proteine in INS-1-Zellen	76
6.4 Analyse eines Glucose-Einflusses auf die Funktionen der USF-Proteine und CK2 in INS-1-Zellen.....	93
6.5 Analyse der Funktionen der USF-Proteine am PDX-1 Promotor in Abhängigkeit von Glucose bzw. CK2-Phosphorylierung in INS-1-Zellen	104
7. Diskussion	119
8. Literaturverzeichnis.....	141
9. Publikationen	177
Danksagung.....	178

1. Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase und Insulinbiosynthese/-sekretion in den β -Zellen des Pankreas ist lebenswichtig und wird durch eine Vielzahl von Enzymen und Transkriptionsfaktoren streng kontrolliert. Daran sind sowohl die Transkriptionsfaktoren der USF-Familie, als auch die Proteinkinase CK2, die aus zwei katalytischen α/α' - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten aufgebaut ist, als Modulatoren beteiligt sind. Anhand von Analysen im Zellkulturmodell der pankreatischen β -Zellen INS-1 aus Ratte konnten im Rahmen dieser Dissertation viele Resultate bezüglich der Interaktion der USF-Proteine mit der CK2, und auch mit dem pankreatischen Transkriptionsfaktor PDX-1, unter Einfluss von Glucose, gezogen werden. Immunfluoreszenzanalysen und Zellfraktionierungen zeigten, dass die USF-Proteine im Zellkern der Inselzellen lokalisiert sind, wo sie zum einen mit beiden CK2-Untereinheiten colokalisiert sind, und dort zum anderen auch an den nukleären Anteil der ubiquitär verteilten CK2 binden. Durch *in vivo*-Phosphorylierungsexperimente konnte die *in vitro* herausgearbeitete CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 auch in INS-1-Zellen bestätigt werden. Ferner konnte auch festgestellt werden, dass eine Hemmung der CK2-Aktivität zum einen die Bindung von USF1 und USF2 aneinander fördert, und zum anderen, dass sich eine CK2-Hemmung auch förderlich auf das Transaktivierungspotential von USF1 am Hämoxxygenase 1-, Fettsäuresynthase- und pankreatischen Glucokinasepromotor auswirkt. Die USF1-Zielgene PDX-1 und Insulin werden durch USF1 in ihrer Transkription reprimiert, wobei diese Transrepression nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität abgeschwächt wird. Weiterführend konnte am PDX-1 Promotor gezeigt werden, dass diese USF1-abhängige Transrepression aus einem Ungleichgewicht mit dem transaktivierenden Faktor PDX-1 resultiert. Ein Glucose-Einfluss konnte weder auf die subzelluläre Lokalisation, die Interaktion, noch auf die Stöchiometrie der USF-Proteine und der CK2 festgestellt werden, während eine Glucose-abhängige Erhöhung der CK2-Kinaseaktivität in INS-1-Zellen stattfindet. Es konnte desweiteren aufgedeckt werden, dass auch Glucose die USF1-abhängige Transrepression der PDX-1- und Insulinpromotoraktivität abschwächen kann, wobei sie dies aber nicht additiv mit einer CK2-Inhibition tut. Analysen der DNA-Bindung am proximalen PDX-1 Promotor zeigten, dass USF1, USF2 und auch PDX-1 an den PDX-1 Promotor binden, während dies für die CK2-Untereinheiten nicht der Fall ist. Glucose und eine CK2-Inhibition vermindern die Bindungsfähigkeit der USFs an den PDX-1 Promotor, während weder Glucose, noch eine CK2-Hemmung, Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von PDX-1 am PDX-1 Promotor nehmen. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Proteinkinase CK2 durch die Phosphorylierung von USF1 die Transkription des Insulins in den

pankreatischen β -Zellen negativ beeinflusst. Dies tut sie über die DNA-Bindefähigkeit des Repressors USF1 am proximalen PDX-1 Promotor, dessen USF1-abhängige Repression nachfolgend auch für die negative Regulation der Transkription des Insulingens verantwortlich ist. Eine CK2-Inhibition wäre damit ein interessantes Target um die Insulintranskription und -produktion in den β -Zellen des Pankreas zu stimulieren, und der Entstehung von Insulin-abhängigen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, entgegenzuwirken.

2. Summary

The maintenance of the glucose homeostasis and the insulin biosynthesis and -secretion in the pancreatic β cells is essential and under the control of many enzymes and transcription factors like the transcription factors of the USF family as well as the protein kinase CK2, which is composed of two catalytic α/α' subunits and two regulatory β subunits. Within this dissertation, the rat pancreatic β cell line INS-1 was used to get a lot of results regarding the interaction between the USF proteins and CK2, as well as the pancreatic transcription factor PDX-1, influenced by glucose. Immunofluorescence analysis and cell fractionation experiments showed a nuclear localization of the USFs where they are co-localized with the ubiquitously expressed CK2 subunits and where they bind to both CK2 subunits. By *in vivo* phosphorylation, the *in vitro* analysed CK2-dependent phosphorylation of USF1 could be confirmed in INS-1 cells. An inhibition of this phosphorylation promoted the association between USF1 and USF2, as well as the USF1 transactivation potential at the hemeoxygenase-, fatty acid synthetase- and glucokinase promoter. The PDX-1 and insulin transcription was repressed by USF1, and this repression was diminished by the CK2 activity. For the PDX-1 promoter this observation arises from an imbalance of USF1 and the transactivating factor PDX-1. There was no glucose influence on either the subcellular localization, or the interaction or the stoichiometry of the USF proteins and CK2, whereas the CK2 activity was increased by glucose in INS-1 cells. The USF1 dependent repression of the PDX-1 and insulin promoter can also be diminished by glucose, but glucose did not act additive to an inhibition of the CK2 activity at this promoters. USF1, USF2 and PDX-1, but not CK2, bind to the proximal PDX-1 promoter. Glucose and CK2 inhibition diminished the binding of the USFs, but not the binding of PDX-1. To sum up, the protein kinase CK2 negatively influences the transcription of insulin in the pancreatic β cells through its phosphorylation of USF1, as the diminished DNA binding of the repressor USF1 at the PDX-1 promoter results in a negative regulation of PDX-1 transcription. As a consequence the insulin transcription is diminished too. A CK2 inhibition could therefore be an interesting target to stimulate the transcription and production of insulin to prevent the development of insulin dependent diseases as diabetes mellitus.

3. Einleitung

3.1 Die Transkriptionsfaktoren der USF-Familie - Struktur und Funktion

Der Kohlenhydratstoffwechsel beschreibt die Vielzahl an Stoffwechselwegen, die zur Synthese, zum Abbau und wechselseitiger Umwandlung aller Kohlenhydrate führt. Im Zentrum dieses Metabolismus steht die Glucose, deren Homöostase im Blut für das Überleben und Wachstum von Zellen und Organen essentiell ist. Die Signalwege und Moleküle dieses Stoffwechselweges sind dabei in vielen Zelltypen ähnlich [204] und ihre Regulation zumeist durch viele Enzyme und Transkriptionsfaktoren gleichermaßen kontrolliert [7]. Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählt die „upstream stimulatory transcription factor (USF)“-Familie mit USF1 und USF2, die als universelle Transkriptionsfaktoren auch bei der Regulation zahlreicher Gene innerhalb einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse mitwirken [43]. USF2 scheint vor allem auch essentiell für die Kontrolle der embryonalen Entwicklung, der Gehirnfunktion, im Metabolismus, bei der Eisenhomöostase und für Fruchtbarkeit und Wachstum von Zellen zu sein, wohingegen USF1 sowohl eine Rolle im Metabolismus, als auch bei der zellulären Antwort auf UV-Strahlung und bei der Immunantwort einzunehmen scheint [43, 267]. Desweiteren üben die USFs eine Funktion beim Schutz von Geweben aus und wirken bei einigen Krebsarten tumorsuppressiv [38, 109]. USF1 und USF2 wurden erstmals in menschlichen Zellen identifiziert, als ihre Beteiligung an der Regulation des späten Adenovirus-Hauptpromotors entdeckt wurde [33, 189, 246]. Bei der Aufreinigung der USF-Proteine aus Zellkernen von HeLa-Zellen wurden zwei ähnliche Polypeptide mit einer Größe von 43 und 44 kDa extrahiert [245, 247], welche durch anschließende Sequenzierung zur Identifizierung der humanen USF1- und USF2-Gene führten [82, 268, 269]. Die Protein- und Genstruktur des humanen USF1 und USF2, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist, ist vollständig untersucht und evolutionär in vielen Spezies konserviert. Die humane USF1 cDNA weist eine >90%ige Sequenzidentität und das Protein sogar >99% Sequenzidentität zum murinen und zum Ratten-USF1 auf [69]. USF1 und USF2 haben eine ähnliche genomische Struktur, wobei durch alternatives Spleißen eine zweite USF2-Isoform, USF2b, entstehen kann, die als dominant-negativer Regulator USF-abhängiger Genexpressionen fungiert [98, 99, 105, 144, 300]. Die USF-Proteine zählen zur hoch konservierten Klasse der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (bHLH-LZ) [19], zu denen weitere bekannte Proteine wie Myc [195] und die Myc-Subfamilie gehören [20, 27, 325]. Die Proteinstruktur ist bei allen Mitgliedern ähnlich aufgebaut und besteht aus verschiedenen funktionellen Bereichen. Zum einen ist dies die USF-spezifische Region (USR), welche als Transaktivierungsdomäne fungiert und über deren Funktion noch relativ

3. Einleitung

wenig bekannt ist [84, 154, 227]. Zum anderen gibt es die basische Region für die DNA-Interaktion [25] und den Helix-Loop-Helix-Bereich sowie die Leucin-Zipperdomäne, die für die Dimerisierung mit anderen basischen HLH-Proteinen und HLH-LZ-Proteinen verantwortlich sind [25, 41]. Die Polypeptidkette von USF1 und USF2 besitzt in der Transaktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne zudem zwei verschiedene Zellkernlokalisationssignale (NLS), welche unabhängig voneinander verwendet werden können und in Maus, Ratte und Mensch konserviert vorliegen [154]. Als reife Proteine werden die USFs ubiquitär exprimiert [82, 268, 269], wobei USF1 und USF2 miteinander sowohl Homo-, als auch Heterodimere ausbilden [268, 269]. Dabei kommen vornehmlich heterodimere Komplexe aus USF1 und USF2 in der Zelle vor [300], deren Mengen sich allerdings Zell-spezifisch in verschiedenen Geweben unterscheiden [268, 300].

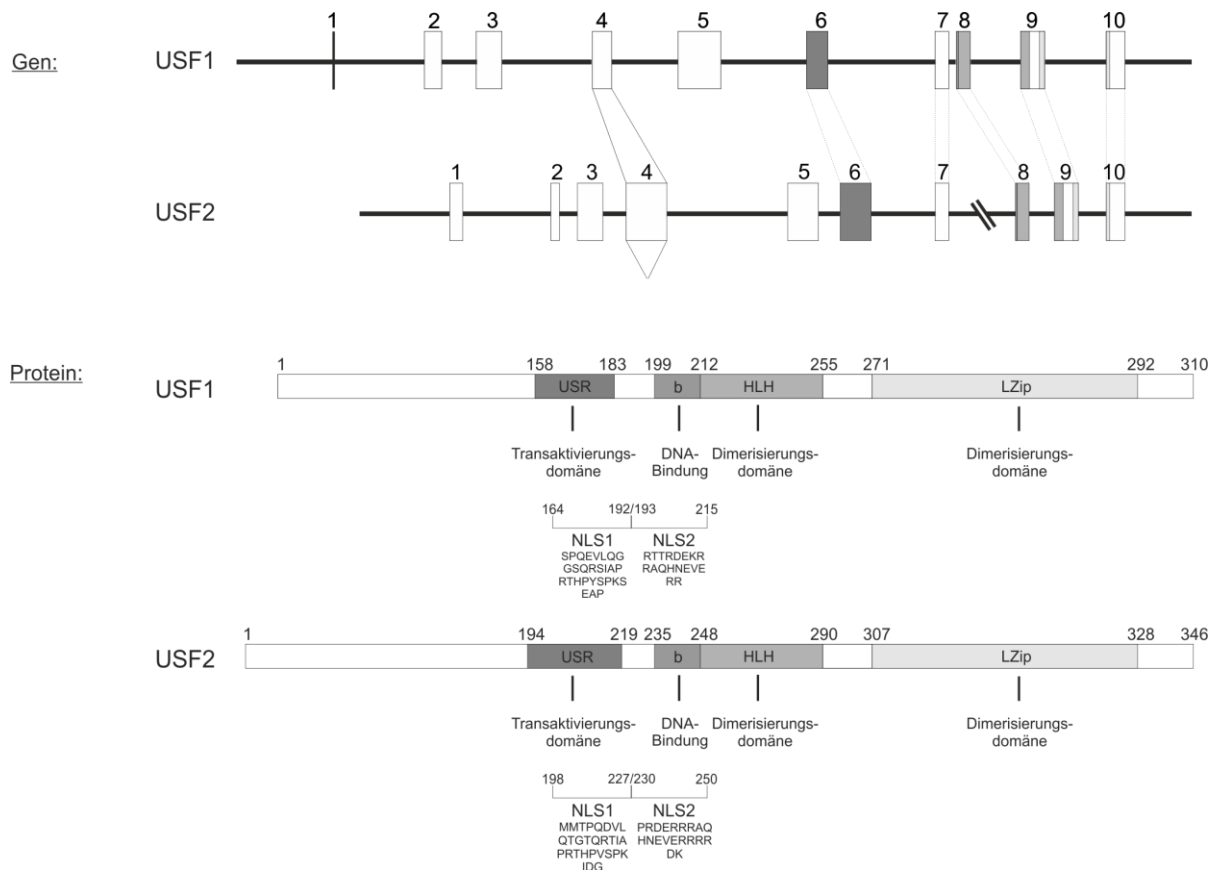


Abbildung 1: Gen- und Proteinstruktur der humanen USF1 und USF2 mit Darstellung der funktionellen Domänen. Die humanen USF1- und USF2-Gene bestehen aus 10 Exons, die bei USF1 einen Bereich von 4 kb und bei USF2 einen Bereich von 10 kb umfassen. Exon 6 codiert bei beiden Genen für die Transaktivierungsdomäne (USR), wohingegen Exon 8 für die basische Region und damit für die DNA-Bindungsdomäne codiert. Ein weiterer Teil von Exon 8 und von Exon 9 bildet den Helix-Loop-Helix-Bereich des Proteins und ist essentiell für die Dimerisierungsfähigkeit der USFs. Zusammen mit Exon 10 codiert Exon 9 auch für den Leucin-Zipper, der ebenfalls zur Dimerisierung mit weiteren HLH-LZ-Proteinen wichtig ist. Innerhalb der Transaktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne befinden sich auch die Zellkernlokalisationssignale (NLS) der

3. Einleitung

Proteine, wobei sowohl USF1, als auch USF2 über zwei verschiedene NLS verfügen. Die Zahlen oberhalb der Genstruktur geben die Nummerierung der Exons an, die Zahlen oberhalb der Proteinstruktur die Positionen der entsprechenden Aminosäuren. USR: USF-spezifische Region, b: basische Region, HLH: Helix-Loop-Helix-Bereich, LZip: Leucin-Zipper, NLS: Zellkernlokalisationssignal. Modifiziert nach: [43].

Zur Ausübung ihrer zentralen Funktion als Transkriptionsfaktoren, müssen USF1 und USF2 an spezifische DNA-Erkennungssequenzen, die sogenannten E-Boxen binden, die aus einer konservierten Sequenz (und einigen potentiell degenerierten Basen) mit den sechs Nukleotiden 5'-CANNTG-3' bestehen. Diese symmetrischen Motive stellen die prinzipiellen Targetmotive aller b-HLH und b-HLH-LZ-Proteine dar und werden selektiv von verschiedenen E-Box Bindeproteinen genutzt. In mehreren Studien zeigte sich hierbei, dass ein AC-Rest in 3'-Position des E-Box Zellkerns zur selektiven Bindung von USF1 an verschiedene Promotoren führt [13, 72, 90, 116, 243, 246]. Dies deutet auf einen Regulationsmechanismus hin, bei dem je nach Kontext und Zelltyp nur einzelne spezifische E-Box Bindeproteine zu spezifischen E-Boxen rekrutiert werden und so eine charakteristische Genregulation stattfindet.

Ein Minimum an USF-Aktivität ist außerdem essentiell für die embryonale Entwicklung, da USF1^{-/-}/USF2^{-/-} Mäuse während der Embryogenese sterben, wohingegen reine USF1^{-/-} Mäuse oder USF2^{-/-} Mäuse zwar lebensfähig sind, aber Abnormalitäten aufweisen. USF2^{-/-} Mäuse zeigen hierbei stärkere Defekte als USF1^{-/-} Mäuse, was die Wichtigkeit von USF2 während der Embryogenese herausstellt [267, 293, 294]. Die gegenseitige Regulation der beiden Isotypen scheint desweiteren asymmetrisch zu sein, denn USF1^{-/-} Mäuse zeigen eine erhöhte Expression von USF2, während USF2^{-/-} Mäuse weniger USF1-Protein exprimieren als wildtypische Mäuse [267]. Dies macht deutlich, dass die zellulären Funktionen der USF-Proteine nicht komplett redundant zu sein scheinen, sondern dass die USF-Dimere zwar ähnliche DNA-Bindungseigenschaften aufweisen, verschiedene Targets aber durch Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren zu kontrollieren vermögen [132, 153]. So hat sich zudem schon in mehreren Studien gezeigt, dass die Anwesenheit und Interaktion mit anderen Coaktivatoren eine wichtige Rolle für die USF-Aktivität spielt [218, 233, 238].

Die Aktivität der USF-Proteine kann auch durch viele verschiedene Signaltransduktionswege moduliert werden. Die genaue Regulation ist im Detail weitestgehend unbekannt, wobei Transkriptionsfaktoren zumeist über ihre Synthese bzw. ihren proteasomalen Abbau [51] oder über posttranslationale Modifikationen, wie Sumoylierung [76, 299], Acetylierung [21] oder Phosphorylierung [318] reguliert werden. Phosphorylierungen gelten als eine der

Hauptregulationsmechanismen für Proteine und sind stets dynamische Prozesse, wobei der Phosphorylierungsstatus eines Transkriptionsfaktors diesen auf mehreren Wegen beeinflussen kann: in seiner subzellulären Lokalisation, in seiner DNA-Bindungsfähigkeit und/oder Oligomerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren oder in seiner Stabilität [318]. Es ist bekannt, dass USF1 und USF2 von einer Vielzahl von Kinasen phosphoryliert werden, wodurch Translokation [66, 106], Stabilität [119] und vor allem DNA-Bindung und Transaktivierungspotential variiert werden. Abbildung 2 zeigt die wichtigsten posttranslationalen Modifikationen (PTM) der USF-Proteine. In der Arbeitsgruppe Montenarh konnte zudem die Proteinkinase CK2 als eine weitere Kinase identifiziert werden, die USF1 phosphoryliert.

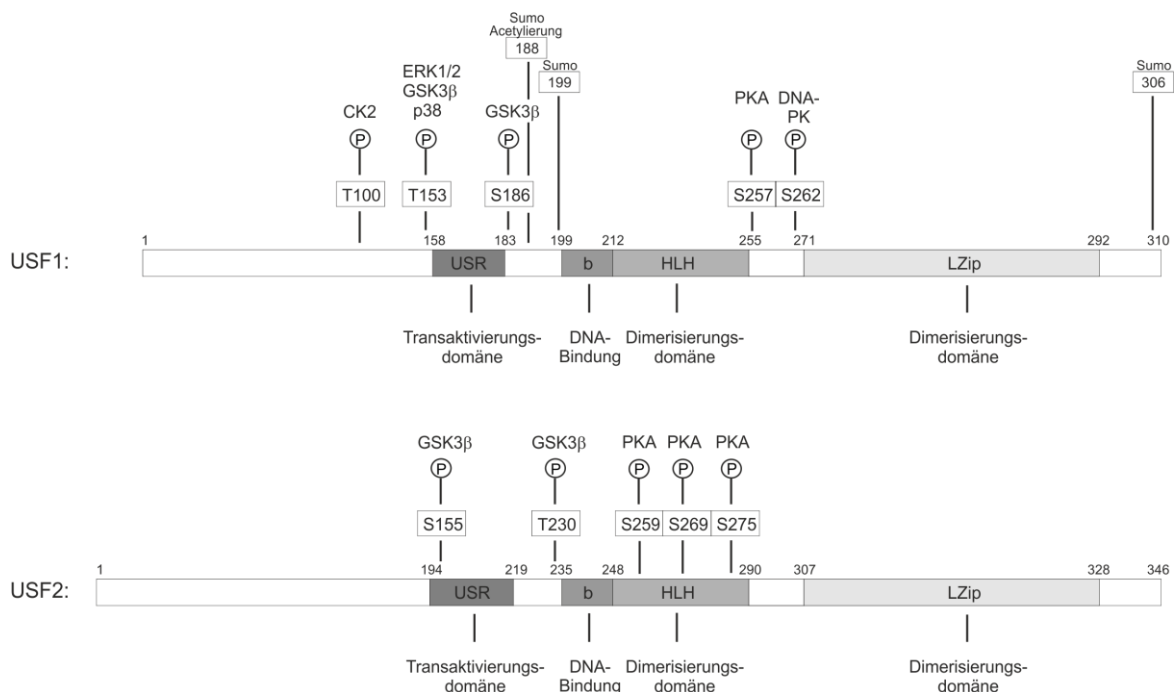


Abbildung 2: Proteinstruktur des humanen USF1 und USF2 mit Darstellung der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen (PTM) und ausführenden Proteinkinasen. Die Zahlen oberhalb der Proteinstruktur geben die Positionen der entsprechenden Aminosäuren an, die Zahlen in den rechteckigen Kästen die entsprechende Aminosäure, die posttranslational modifiziert wird. Oberhalb des rechteckigen Kastens mit der Aminosäure ist die posttranslationale Modifikation (PTM) (P: Phosphorylierung; Sumo: Sumoylierung, Acetylierung) und darüber die entsprechende Kinase, die die Aminosäure an dieser Stelle phosphoryliert, angegeben. USR: USF-spezifische Region, b: basische Region, HLH: Helix-Loop-Helix-Bereich, LZip: Leucin-Zipper, S: Serin, T: Threonin, P: Phosphorylierung, Sumo: Sumoylierung. Modifiziert nach: [43].

3.2 Die Proteinkinase CK2

Wie am Beispiel der USF-Proteine gezeigt, repräsentieren Phosphorylierungen die überwiegende Anzahl an posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. Proteinphosphorylierungen werden durch entsprechende Proteinkinasen ausgeführt und sind an einer

Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt, wie Signaltransduktion, DNA-Replikation, Proliferation und Wachstum [203]. Die Proteinkinase CK2, die erstmals 1954 als Caseinkinase 2 identifiziert wurde [190], ist eine ubiquitär vorkommende Serin-/Threoninkinase, die in vielen Spezies hoch konserviert vorliegt und essentiell für die Lebensfähigkeit eukaryoter Zellen ist [31]. Sie phosphoryliert vor allem Serine und Threonine in saurer Umgebung mit der charakteristischen Erkennungssequenz S/TxxE/DpY, wobei sowohl ATP, als auch GTP als Phosphatdonor genutzt werden können [94]. Die CK2 liegt in der Zelle im überwiegenden Teil als Heterotetramer vor, welches aus zwei katalytischen α/α' -Untereinheiten und zwei nicht-katalytischen β -Untereinheiten zusammengesetzt wird [145]. Als aktives Enzym können so weit mehr als 400 Substrate von der CK2 phosphoryliert werden [175], wobei die verschiedenen Untereinheiten auch unabhängig voneinander innerhalb der Zelle vorzufinden sind [58, 62, 87, 156, 276] und eigenständige Funktionen außerhalb des Holoenzym zu haben scheinen [37, 86, 87, 145, 223, 252]. Neueren Untersuchungen zufolge liegt die CK2 außerdem nicht nur als Tetramer innerhalb der Zelle vor, sondern bildet auch höhermolekulare Oligomere aus, die symmetrisch aufgebaut sind [149, 150]. Was die Proliferation betrifft, konnte in Arbeiten an „CK2-knockout“-Mäusen gezeigt werden, dass eine Deletion von CK2 α oder CK2 β embryonal letal ist [152]. Die CK2 α' -Untereinheit scheint eine spezifische Funktion bei der Spermatogenese einzunehmen, da bei Deletion beider Allele männliche Tiere zwar lebensfähig, aber infertil sind [137, 322]. Weitere wichtige Funktionen der CK2 konnten zudem bei vielen zellulären Prozessen beobachtet werden, wie bei der Regulation von Genexpressionen, Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese sowie Seneszenz [92, 124, 146, 183, 190, 191, 217, 253, 270]. In vielen Tumorzellen scheint die CK2 als anti-apoptotische Kinase zudem eine zentrale Rolle bei der malignen Transformation von Zellen einzunehmen [4, 85, 194, 291].

3.3 Rolle der USF-Proteine und CK2 im Kohlenhydratstoffwechsel

Vor allem die Leber, als stoffwechselvielfältigstes Organ, ist sowohl in den Kohlenhydrat-, als auch in den Fett- und Proteinmetabolismus involviert und viele Aspekte bezüglich des Kohlenhydratstoffwechsels haben sich primär in Leberzellen herauskristallisiert. Untersuchungen in Hepatozyten zeigten so auch die ersten Indizien für das Vorkommen der USF-Proteine [245, 247], weshalb die Rolle der USFs beim Glucose- und Fettstoffwechsel vor allem in Leberzellen analysiert wurde. Dort sind bereits eine Vielzahl von Genen mit E-Box Motiven in ihren Promotoren bekannt, die durch die USFs reguliert werden [43]. So nehmen diese zum Beispiel Einfluss auf die Steuerung des Insulinrezeptorgens [228] und auf

die Expression des Insulin Wachstumsfaktor-bindendes Protein 1-Gens (IGF-BP1), indem letzteres bei Proteinmangel hochreguliert wird [172]. Der hepatische Glucosemetabolismus wird desweiteren durch Bindung der USFs im Promotorbereich des Glucagonrezeptorgens [219], des L-Typ Pyruvatkinasegens [127, 141] und der hepatischen Glucokinase [112, 187] beeinflusst, die kritische Elemente bei der Verstoffwechselung von Glucose darstellen. USF1 ist zudem stark in die Lipogenese involviert, indem es im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen auf die Expression einer Vielzahl weiterer Gene einwirkt, wie die Fettsäuresynthase (FAS) [83, 305], Apolipoprotein E [237], hepatische Lipase [296, 297] und Acetyl-CoA Carboxylase [288].

Eine der zuerst identifizierten Kinasen bei Analysen des Kohlenhydratstoffwechsels war die Proteinkinase CK2 [7], obwohl über ihre spezifische Rolle hierbei bis dato noch nicht allzu viel bekannt ist. Obwohl schon vor einiger Zeit erhöhte Kinaseaktivitäten der CK2 in stoffwechselaktiven Organen wie Gehirn, Leber und Skelettmuskel gefunden wurden, sind bislang allerdings nur wenige CK2-Substrate im Kohlenhydratstoffwechsel identifiziert worden [50, 81, 89, 283, 326]. Der Einfluss der CK2 bei der Verwertung von Kohlenhydraten besteht dabei sowohl in hormoneller Regulation der metabolen Signalwege, als auch im direkten Einfluss auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels [7]. So reguliert die CK2 den Kohlenhydratstoffwechsel hormonell über die Produktion und Freisetzung von Insulin, indem zum Beispiel die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors durch CK2-Phosphorylierung in dessen intrazellulärer, aktivierender Domäne reduziert wird [81, 166], oder indem das Insulinrezeptor-Zielprotein „Insulin Rezeptor Substrat 1“ (IRS1) Insulin-abhängig von der CK2 phosphoryliert wird [283]. Eine enzymatische Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels durch die CK2 geschieht durch Phosphorylierung verschiedener Proteine, wie zum Beispiel der Glykogensynthase, deren Aktivität dadurch gemindert wird [50, 226]. Weitere CK2-Substrate sind die Phosphoglucose-Isomerase [89] und der Transkriptionsfaktor Sp1, der bei der Expression der Acetyl-CoA Carboxylase eine Rolle spielt [326]. CK2 kann allerdings nicht nur selbst Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel nehmen, sondern dieser auch auf sie, sprich CK2 kann ihrerseits durch Glucose und Insulin reguliert werden [36, 130, 159, 272].

Neben Leber- und Fettzellen nehmen die Pankreaszellen, und vor allem die β -Zellen des Pankreas, ebenfalls entscheidend am Kohlenhydratstoffwechsel teil, indem sie wichtige regulatorische Hormone, nämlich Insulin und Glucagon, in Abhängigkeit von Glucose produzieren und sekretieren [17].

3.4 Das Pankreas und die Glucose-stimulierte Insulinsekretion

Das Pankreas ist ein in Wirbeltieren befindliches Drüsenorgan, welches aus mehreren verschiedenen Zelltypen besteht, die für unterschiedliche Funktionen des Pankreas verantwortlich sind. Die Aktivität des Pankreas ist dabei essentiell für das Überleben von Wirbeltieren, wobei eine exokrine, als auch eine endokrine pankreatische Funktion unterschieden werden [280]. Zur Ausübung der exokrinen, also der „nach außen abgebenden“ Funktion des Pankreas dienen exokrine Zellen, welche über 90% des Gesamtorgans ausmachen. Diese produzieren Verdauungsenzyme wie Proteasen, Amylasen, Lipasen und Nukleasen, welche nach Aktivierung für die vollständige Verdauung von Nahrungsbestandteilen verantwortlich sind [18]. Das endokrine Pankreas besteht aus den sogenannten Langerhans-Inseln, die als kleinere Zellansammlungen etwa 1-2% der Masse des Pankreas ausmachen [6]. Diese bestehen aus 5 verschiedenen Hauptzelltypen, wovon jeder sein eigenes Sortiment an Hormonen produziert [280]. Die α -Zellen, die etwa 15-20% der Langerhans-Insel ausmachen, produzieren Glucagon, die β -Zellen, die den größten Anteil der Inseln mit 60-80% darstellen, sezernieren Insulin und die δ -Zellen (3-10% der Inseln) sind für die Synthese von Somatostatin zuständig. Desweiteren gibt es die pankreatischen Polypeptidzellen und die Ghrelin-produzierenden ϵ -Zellen [18]. Als zentrales Protein für die Entwicklung des Pankreas steht dabei PDX-1 als erstes Genprodukt im Mittelpunkt, welches während der embryonalen Organogenese in allen Zelltypen exprimiert wird [107] und im adulten Organ nur noch in β - und δ -Zellen des endokrinen Pankreas vorkommt [56]. Für die endokrine Funktion des Pankreas sind die β -Zellen, die den Zellkern der Insel bilden, besonders essentiell, da sie für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase in der Zelle verantwortlich sind, indem sie auf einen Glucosereiz hin mit der Ausschüttung von Insulin ins Blut reagieren und so den Blutzuckerspiegel im Organismus senken. Der Ablauf dieser Glucose-stimulierten Insulinsekretion ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie stellt eine Signalkaskade dar, in deren Verlauf mehrere pankreatische Gene aktiviert und Kanäle in der Zellmembran geöffnet oder geschlossen werden [17, 178]. Dieser Mechanismus ist von einem Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen strengstens reguliert. In Abhängigkeit von Glucose regulieren diese Transkriptionsfaktoren aufgrund ihrer Lokalisation und/oder der Dauer ihrer Wirkung koordiniert verschiedene Gene innerhalb der Kaskade, bzw. das Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen in der Zellmembran. Dabei steht die Regulation der Insulinproduktion und -sekretion im Mittelpunkt dieses Mechanismus.

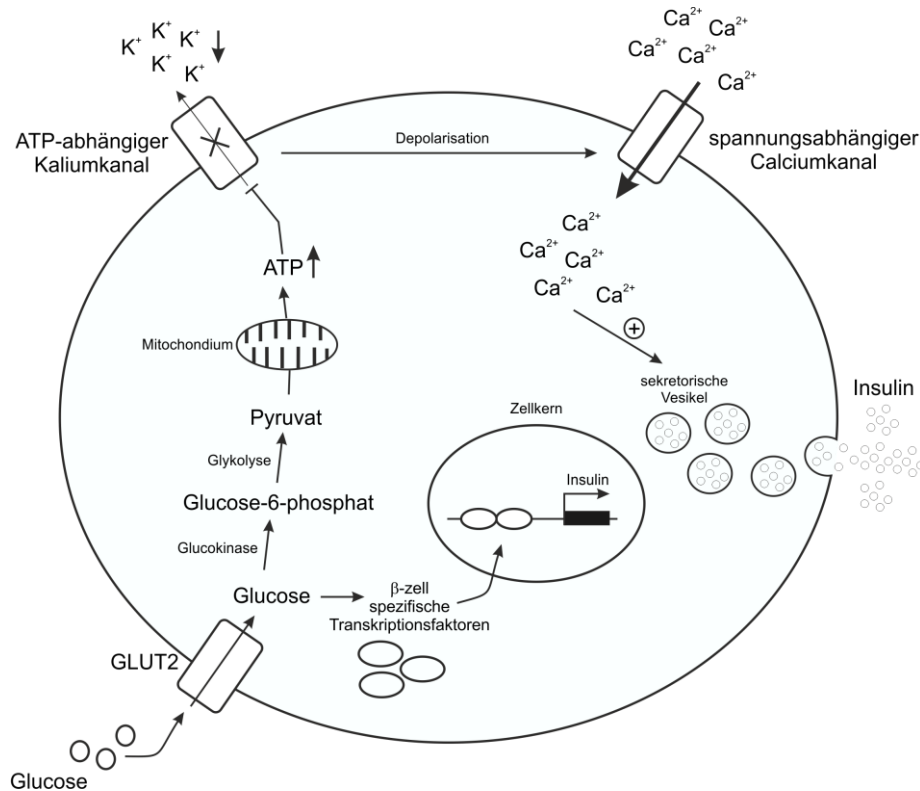


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle. Glucose wird über den GLUT2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen und im Rahmen der Glykolyse und weiterführend im Mitochondrium verstoffwechselt. Durch den zellulären Anstieg an ATP kommt es zum Schließen von Kaliumkanälen und durch die eintretende Depolarisation an der Zellmembran zum Öffnen von Calciumkanälen, was in einer Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes resultiert. Auf diese Calciumerhöhung hin wird Insulin aus der Zelle freigesetzt. Zudem wird die Insulinproduktion durch den Glucosestimulus auf Transkriptionsebene durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren angeschaltet.

3.5 Rolle der USF-Proteine und CK2 bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion

Unter den Faktoren, die an der Regulation der Funktionalität des Pankreas und der Glucose-stimulierten Insulinregulation beteiligt sind, spielen sowohl USF1 und USF2, als auch CK2 eine zentrale Rolle. Im Rahmen mehrerer Diplom- und Doktorarbeiten in der Arbeitsgruppe Montenarh wurde der Einfluss der CK2 bei der Glucose-stimulierten Insulinregulation bereits ausführlich in den murinen pankreatischen β -Zellen MIN6 untersucht [133, 182, 313]. Rui Meng konnte in ihren Arbeiten bereits zeigen, dass der pankreatische Transkriptionsfaktor PDX-1, der eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Organs sowie dem Funktionserhalt der pankreatischen β -Zelle spielt [125], ein Substrat der CK2 darstellt [183]. Zudem konnte sie nachweisen, dass eine Behandlung von β -Zellen mit Insulin zu einer erhöhten CK2-Aktivität führt, die in einer Verminderung der Insulinsekretion resultiert, und dass PDX-1 nach

Phosphorylierung durch die CK2 destabilisiert und proteasomal abgebaut wird [125]. Was die subzelluläre Lokalisation betrifft, konnte Sabrina Klein in ihrer Diplomarbeit bereits zeigen, dass es nach Zugabe von Glucose, ähnlich wie bei PDX-1, zu einer Zeit- und Glucose-abhängigen Translokation der CK2-Untereinheiten, allerdings unabhängig von PDX-1 und dessen Phosphorylierung durch die CK2, in den Zellkern der pankreatischen β -Zellen gibt [314]. Desweiteren konnte sie in ihrer Doktorarbeit eine Glucose-abhängige Erhöhung der CK2-Kinaseaktivität ohne gleichzeitige Änderung der Proteinexpression nachweisen. Was die Stöchiometrie der CK2 betrifft, konnte weder von Insulin, noch von Glucose ein Einfluss ihrerseits festgestellt werden. Eine Promotor-spezifische Regulation durch die CK2, abhängig von der PDX-1-Phosphorylierung, konnte für die pankreatischen Gene Insulin und Glucokinase herausgearbeitet werden [133, 314].

Auch für die USF-Proteine sind Funktionen im Pankreas und speziell auch bei der Glucose-stimulierten Insulingenregulation in den β -Zellen bekannt. So sind, ähnlich wie in der Leber, auch im Pankreas homologe Proteine identifiziert worden, in deren Promotoren E-Box Motive vorkommen, an die USF1 und USF2 binden und so die Expression der entsprechenden Gene beeinflussen. Zum einen ist dies der eben erwähnte Transkriptionsfaktor PDX-1, für den sowohl eine USF-Bindung an ein E-Box Motiv im proximalen PDX-1 Promotor beschrieben [260], als auch eine transaktivierende Funktion der USF-Proteine auf die PDX-1 Genexpression herausgestellt wurde [224]. Auch für den pankreatischen Glucokinase-promotor konnte bereits eine Bindung der USFs im „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) entdeckt werden, wobei betont wurde, dass diese Bindung essentiell für die Aktivität der Glucokinase in den β -Zellen ist [187]. Eine Rolle der USF-Proteine bei der Regulation der L-Typ Pyruvatkinase in β -Zellen ist zwar in der Literatur diskutiert, aber noch nicht genau geklärt [48, 128, 306]. Für den Insulinpromotor konnten bisher zwei E-Box Motive identifiziert werden, wobei Motiv IEB1 essentiell für die Expression des Gens zu sein scheint [54, 126], Motiv IEB2 zwar USF bindet, aber keinen Effekt auf die Insulinpromotoraktivität hat [228]. Desweiteren gibt es noch weitere pankreatische Gene, die zwar bei der Insulinproduktion und -sekretion keine direkte Rolle spielen, aber ebenfalls für den Erhalt der β -Zellen wichtig sind und USF-abhängig reguliert werden, wie zum Beispiel Alx3 [61].

3.6 Zielsetzung der Arbeit

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kietzmann in Oulu (Finnland), konnte in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit USF2 als Fänger vier Mal CK2 β als Bindungspartner identifiziert werden. Da in der Literatur bisher noch keine Daten bezüglich einer Interaktion der USF-

Proteine und CK2 vorlagen, war es nach diesem ersten Experiment interessant, diese CK2/USF-Interaktion genauer zu charakterisieren. In ersten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Montenarh durch Prof. Dr. Claudia Götz wurden daher USF1 und USF2 zunächst bakteriell exprimiert und aufgereinigt und einer *in vitro*-Phosphorylierung mit CK2-Holoenzym unterzogen, um eine mögliche Enzym-Substrat-Interaktion zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass USF1, nicht aber USF2 durch das CK2-Holoenzym phosphoryliert wird [155]. Um die Phosphorylierungsstelle genauer zu bestimmen, wurde die Aminosäuresequenz von USF1 anschließend mithilfe computerbasierter Programme auf mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen untersucht, die der Konsensussequenz S/TxxE/DpY entsprechen. Hierbei konnten sieben putative Aminosäuren identifiziert werden, woraufhin einzelne Peptidfragmente von USF1 hergestellt wurden, die eine oder mehrere mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen besitzen, und diese Fragmente erneut einer *in vitro*-Phosphorylierung mit CK2-Holoenzym unterzogen [155]. Mittels ortsgerichteter Mutagenese der möglichen CK2-Phosphorylierungsstellen an Position 100 und 110, konnte schließlich das Threonin an Position 100 der Aminosäurekette von USF1 als Hauptphosphorylierungsstelle ausgemacht werden, obwohl weitere Phosphorylierungsstellen nicht komplett ausgeschlossen werden können [155].

Die bisher erhaltenen Resultate werfen eine Reihe offener Fragen auf. In der vorliegenden Dissertation wird deshalb die Wechselwirkung zwischen den USF-Proteinen und CK2 auf molekularer Ebene untersucht, indem zum einen die Interaktion und Lokalisation der beiden Proteine charakterisiert, und zum anderen die CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 in den β -Zellen des Pankreas im Zellkulturmodell analysiert wird. Zudem wird die Bedeutung der Phosphorylierung von USF1 auf die Dimerisierungs- und Transaktivierungsfunktion der USFs bei Prozessen, die im Rahmen der Glucose-stimulierten Transkription des Insulins in den β -Zellen des Pankreas ablaufen, herausgearbeitet. Auch der Einfluss von Glucose als zentraler Stimulus der Transkription und Sekretion von Insulin wird in Bezug zur USF/CK2-Interaktion gesetzt und die daraus resultierenden Effekte auf die Funktionen Dimerisierung und Transaktivierung untersucht. Neben einem potentiellen Einfluss von Glucose auf die Expression und Lokalisation der beiden Proteine wird weiterhin auch die Aktivität der CK2 auf diesen physiologischen Stimulus hin überprüft.

Durch Analysen der DNA-Bindung der USF-Proteine am PDX-1 Promotor, soll die Rolle der USFs bei der Aufrechterhaltung der Pankreasfunktionalität geklärt werden. Hierbei wird zum einen untersucht, ob die CK2 zur Phosphorylierung von USF1 zusammen mit USF1 und USF2 an die DNA bindet, und zum anderen, ob die Phosphorylierung einen Einfluss auf die

3. Einleitung

Bindung der USF-Proteine an den PDX-1 Promotor nimmt. Auch der Einfluss von Glucose auf die DNA-Bindungsfunktion der USF-Proteine am PDX-1 Promotor soll weitergehend, auch zusammen mit einem möglichen Einfluss der Phosphorylierung von USF1 durch die CK2, herausgearbeitet werden.

Zusammenfassend sollen die beschriebenen Experimente dazu dienen, weitere Funktionen sowohl von USF1 und USF2, als auch von CK2 in den β -Zellen des Pankreas aufzudecken und die Rolle der USF-Proteine und CK2 bei der Kontrolle der Transkription der PDX-1- und Insulingene in Abhängigkeit von Glucose besser zu verstehen.

4. Materialien

4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2 ml/5 ml/10 ml Einmalspritze Injekt® Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
1.7 ml/2 ml/ 5 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
15 ml/50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
6/24-Loch Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
96-Loch Platten weiß Nunc®	Sigma-Aldrich, München
145-mm/100-mm/60-mm Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
Abbé-Refraktometer	Carl Zeiss, Jena
Autoklav Varioklav® 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Beckman L-60 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Brutschrank 6000 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Inc., Hanau
Corex®-Röhrchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dampfsterilisator Varioklav 500	H+P Labortechnik GmbH, München
Deckgläschen, Durchmesser 12 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Own Systems P9DS	Systems, Inc., Portsmouth
Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small	Hoefer Inc., Holliston
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Glasplatten für Elektrophorese	Hoefer Inc., Holliston
Gradientenmischer	Eigenbau
Feinwaage Zellkern 770	Zellkern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Filterspitzen (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl 10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Hamilton MICROLITER Spritze	Hamilton, Bonaduz
Heizblock	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Infinite M200 Pro TECAN Reader	Sigma-Aldrich, München
Inkubator	Heraeus Inc., Hanau
20 G-, 21 G-, 23 G-BD Microlance™ 3-Kanülen	Becton, Dickson and Company, Heidelberg

4. Materialien

Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma-Aldrich, München
Labor-Glasware	Schott, Mainz
MACS MultiStand	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
µMACS Separator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Milli-Q Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Millipore, Schwalbach/Ts
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nucleobond®-Säulen	Macherey Nagel, Düren
P81 Ionenaustausch-Filterpapier	Whatman, Kent
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR Reader Mx3000Pro™	Agilent Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Petrischalen 94 mm	Greiner, Nürtingen
pH-Meter, pH537	WTW, Weilheim
Phosphor Imager Typhoon 9410	GE Healthcare, München
Phosphor Imaging-Platten (Storage Phosphor Screen)	Amersham Biosciences, München
Pipetten (1000 µl, 200 µl)	Gilson, Villiers le Bel
Pipette (20 µl)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Pipette (10 µl)	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl 10 µl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Polyallomer Röhrchen 13.2 ml, 14 x 89 mm	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Powergeräte	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
Röntgenfilm (AGFA Cronex 5)	AGFA-Gevaert, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gevaert, Belgien
Schwenkbecherrotor SW 41 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sterilbank LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
SW-41 Ti Rotor Swinging Buckets	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Szintillationsanalysator 190S AB/LA	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

4. Materialien

Thermomixer IKA [®] RCTbasic	IKA [®] GmbH und Co. KG, Staufen
Thermoschüttler CertoMat [®] H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ultraschallbad Transonic 460	Elma GmbH, Singen/Htw
Universal Hood II-System	BioRad, München
UV-Quarzküvette 10 mm	Hellma, Müllheim
UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience, München
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL Laborgeräte, Burgwedel
Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese [®] Gel30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
BioRad Protein Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete [®] Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie-Brilliant-Blue G250 und R250	Boehringer, Ingelheim
CX-4945	Selleckchem, Houston
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, München
Duolink [®] <i>In Situ</i> Mounting Medium mit DAPI	Sigma-Aldrich, München
Duolink [®] <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Kaninchen PLUS	Sigma-Aldrich, München
Duolink [®] <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Maus MINUS	Sigma-Aldrich, München
ECL Lumilight System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Pharmacia Biotech, Schweden

4. Materialien

Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
FCS	Biochrom GmbH, Berlin
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
GeneRuler™ DNA 100 bp Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Lachssperma	AppliChem, Darmstadt
LB-Both-Medium	Sigma-Aldrich, München
Luciferase-Reagenz	Promega GmbH, Mannheim
Luminol Lumi-Light	Roche, Mannheim
Lysepuffer (cell culture lysis 5x)	Promega GmbH, Mannheim
Nonidet® P40 (NP 40)	Fluka BioChemika, Schweiz
Protein A/G-Sepharose	Amersham Biosciences AB, Uppsala
Quinalizarin	Labotest OHG, Niederschöna
PhosSTOP Phosphatasehemmer	Roche, Mannheim
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Österreich
RPMI 1640-Medium	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640-Medium ohne Glucose	Life Technologies, Darmstadt
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
TBB	Calbiochem, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin	MP Biomedicals, Heidelberg
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Turbofect® Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
ViaFect™ Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim
Verschiedene gewöhnliche Laborchemikalien	Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Steinheim, Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fischer, Saarbrücken

4.1.3 Radiochemikalien

[³² P]-Orthophosphorsäure (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³² P]-γ-ATP (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³² P]-γ-GTP (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig

4.1.4 Enzyme

CK2-Holoenzym	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh, Universität des Saarlandes
Phusion [®] HF DNA-Polymerase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin

4.1.5 Experimentelle Kits

Duolink [®] <i>InSitu</i> PLA Detection Reagents Red	Sigma-Aldrich, München
ELISA-Kit Rat/Mouse Insulin	Millipore, Schwalbach/Ts
Luciferase-Assay Kit	Promega GmbH, Mannheim
Nucleobond [®] PC 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Turbofect [®] Transfektions-Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
µMACS Streptavidin Kit	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Q5 Site-directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Frankfurt/Main
ViaFect [™] Transfektions-Kit	Promega GmbH, Mannheim

4.2 Nährmedien für Bakterien

Für die Herstellung von LB-Broth-Medium werden 1% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, sowie 1% NaCl in H₂O_{deion.} gelöst und anschließend autoklaviert. Aus einem Liter LB-Broth-Flüssigmedium wird nach Zugabe von 2% Bacto-Agar und nachfolgendem Autoklavieren LB-Broth-Agar hergestellt, welcher nach Erhitzen zur Selektion mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 50 µg/ml und Tetracyclin 12.5 µg/ml) versehen und in 100-mm Kulturschalen gefüllt wird.

4.3 Molekulargewichtsmarker

4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente wird der „GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder“ oder „GeneRuler™ DNA 100 bp Ladder“ eingesetzt, welcher 14 diskrete Fragmente innerhalb von 250 bp bis 10.000 bp Größe enthält. Für die Agarosegel-Analyse werden 5 µl dieses Markers mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt.

4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ dient zur Darstellung der Proteinauftrennung während der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und zur Verifizierung der Western Blot Transfereffizienz und Abschätzung der Proteingrößen im Blot. Es ist ein Proteinstandard mit 6 Proteinen, die ein Molekulargewicht von 20 bis 120 kDa abdecken (120 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*); 85 kDa: Rinderserumalbumin (Rinderplasma); 50 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß); 34 kDa: Carboanhydrase (Rindererythrocyten); 26 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch); 20 kDa: Lysozyme (Hühnereiweiß), welche kovalent an einen blauen Chromophor gekoppelt sind (Thermo Scientific, St. Leon-Rot). Neben dem „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ gibt es noch zusätzlich den „Unstained Protein Molecular Weight Marker“, der 7 Proteine mit Molekulargewichten von 14.4 bis 116 kDa umspannt (116 kDa: β -Galactosidase; 66.2 kDa: Rinderserumalbumin; 45 kDa: Ovalbumin; 35 kDa: Lactat-Dehydrogenase; 25 kDa: REase Bsp98I; 18.4 kDa: β -Lactoglobulin; 14.4 kDa: Lysozyme), und durch die Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden kann.

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Typ
α -Tubulin	Polyklonaler Maus-Antikörper (clone DM1A, Sigma-Aldrich, München), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung: 1:2.000 (Western Blot)
CK2 α -Peptid	Kaninchen-Antiserum #26 (AS 360-371, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh [60]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)

4. Materialien

	Monoklonaler Maus-Antikörper 1A5 (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh [251]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:200 (Western Blot)
CK2β-Peptid	<p>Kaninchen-Antiserum #32 (AS 119-129, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh [60]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Monoklonaler Maus-Antikörper 6D5 (AS 119-129, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh [251]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:50 (Western Blot)</p> <p>Monoklonaler Maus-Antikörper E-9 (sc-46666, AS 1-215, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:25 (Immunfluoreszenz)</p>
FLAG	Monoklonaler Maus-Antikörper (Anti-FLAG M2, Sigma-Aldrich, München), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:2.000 (Western Blot)
Nucleolin	Kaninchen-Antiserum #36 (AS 119-129, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh [80]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot)
PDX-1	Polyklonales Kaninchen-Antiserum (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot)
TFIID	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (sc-273 (SI-1), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:500 (Western Blot)
USF1	<p>Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (sc-229 (C-20), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:500 (Western Blot), Verdünnung 1:50 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (sc-8983 (H-86), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:500 (Western Blot)</p>

	Polyklonaler Maus-Antikörper (sc-390027 (G-2), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:50 (Immunfluoreszenz)
USF2	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (sc-862 (C-20), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:500 (Western Blot), Verdünnung 1:50 (Immunfluoreszenz)

4.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Typ
Kaninchen IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Dianova Hamburg), Verdünnung 1:30.000 (Western Blot)
	Alexa-Fluor TM 594-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Molecular Probes, Darmstadt), Verdünnung 1:1.000 (Immunfluoreszenz)
Maus IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Dianova Hamburg), Verdünnung 1:10.000 (Western Blot)
	Alexa-Fluor TM 488-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Molecular Probes, Darmstadt), Verdünnung 1:500 (Immunfluoreszenz)

4.5 Bakterienstämme

***Escherichia coli* XLI blue:** Der Bakterienstamm besitzt eine Tetracyclinresistenz und wird zur Plasmidamplifikation verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* {F' *proAB lacI^qΔM15* Tn10 (Tet^R)}

Quelle: Stratagene, Waldbronn

4.6 Zelllinie

Tabelle 3: Verwendete Zelllinie

Name	Beschreibung	Quelle
INS-1	Ratten Insulinoma-Zellen, Glucose-responsiv Passagen <60	Prof. Dr. G. Thiel, Homburg

4.7 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz von 5' zu 3'	Orientierung	T _m
komparative PCR PDX-1	CAG GAC AGG AGA GAT CAG CC	3'	60°C
komparative PCR PDX-1	Biotin/GCA GCT CAC GGA CTC TCA	5'	60°C
komparative PCR PDX-1mut	AGG CTG AAC CAT CGC TGG GTG CCT CAG AGC C	3'	60°C
komparative PCR PDX-1mut	Biotin/ GGG CCA CCA TTG GCC TGG	5'	60°C

4.8 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Marker	Details	Quelle
p3xFLAG-Myc-CMV24	AMP	Säuger Expressionsvektor für FLAG- und Myc-getaggte Fusionsproteine unter der Kontrolle eines CMV- Promotors	Prof. Dr. T. Kietzmann, Oulu
p3xFLAG-USF1-Myc- CMV24	AMP	cDNA des humanen USF1 (930 bp)	Prof. Dr. T. Kietzmann, Oulu
p3xFLAG-USF1 _{T100A} - Myc-CMV24	AMP	cDNA des humanen USF1 (930 bp) mit Austausch von ACC an Position 100 durch	Prof. Dr. M. Montenarh, Homburg

		GCC	
p3xFLAG/CMV-7.1 -PDX-1 WT	<i>AMP</i>	cDNA des murinen Volllängen PDX-1 (855 bp)	Prof. Dr. M. Montenarh, Homburg [183]
pHOGL3/4.5 (Hämoxygenase- promotor)	<i>AMP</i>	Humaner Hämoxygenasepromotor 1 (HO-1)	Prof. Dr. G. Thiel, Homburg
pGEM3ZFM- RIP1-POLYA (Insulinpromotor)	<i>AMP</i>	Ratten Insulinpromotor 1 (RIP 1) nt -410/+ 51	Prof. Dr. M-J. Boucher, Umeå [29]
-6500-STF-luc (Volllängen-PDX-1- Promotor)	<i>AMP</i>	Ratten PDX-1 Promotor (STF1) nt -6500/+68	Prof. Dr. M. Montminy, La Jolla [260]
pGL3-Basic -GK-1448-Luc (Glucokinasepromotor)	<i>AMP</i>	Ratten Glucokinasepromotor (GK), pankreasspezifisch nt -990/+14	Prof. Dr. T. Kietzmann, Oulu
pGL3-rFAS-promLuc (Fettsäuresynthase- Promotor)	<i>AMP</i>	Ratten Fettsäuresynthase- Promotor (FAS) nt -220/+25	Prof. Dr. T. Kietzmann, Oulu

4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine

Tabelle 6: Verwendete gereinigte, rekombinante Proteine

Name	Details
CK2 Holoenzym	Prof. Dr. M. Montenarh

4.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer (6x)	80% 2x TAE-Puffer 20% Glycerol 0.25% (w/v) Bromphenolblau
-----------------------	---

4. Materialien

	0.25% (w/v) Xylene cyanol FF Lagerung bei Raumtemperatur
TAE-Puffer (10x), pH 7.2	400 mM Tris-Acetat 200 mM Na-Acetat 10 mM Na ₃ -EDTA gelöst in H ₂ O _{deion.} , autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 8: Antibiotika und Puffer für Bakterien

Ampicillin	50 mg/ml gelöst in 1 ml H ₂ O _{deion.} , sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
LB-Broth-Agarplatten	2% Bacto-Agar 1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O _{deion.} , autoklaviert bei Gebrauch mit entsprechenden Antibiotika versehen (50 µg/ml Ampicillin, 12.5 µg/ml Tetracyclin), Lagerung bei 4°C
LB-Broth-Medium	1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O _{deion.} , autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N2, pH 6.3	100 mM Tris-HCl, pH 6.3 1.15 M KCl 15% Ethanol 0.15% (v/v) Triton X-100 gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N3, pH 6.3	100 mM Tris-HCl

4. Materialien

	1.15 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N5, pH 8.5	100 mM Tris-HCl 1 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer S1, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Lösung S2	0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer S3, pH 5.1	2.8 M K-Acetat gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Tetracyclin	6.5 mg/ml gelöst in 1 ml H ₂ O _{deion.} , sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>) pH 7.0	100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol gelöst in H ₂ O _{deion.} , autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur
TfBII, (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>) pH 7.0	75 mM CaCl ₂ 10 mM Na-MOPS 10 mM KCl

4. Materialien

	15% Glycerol gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Tabelle 9: Medium für Zellkultur	
Glucose Stocklösung	2 M D (+)-Glucose gelöst in H ₂ O _{deion.} , sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Trypsin/EDTA Lösung, pH 7.5	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA gelöst in PBS, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Tabelle 10: Puffer für zelluläre Proteinextraktion	
Sigma-Lysepuffer, pH 7.4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Ripa-Lysepuffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% (v/v) Triton X-100 0.1% SDS gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Zelllysepuffer A, pH 7.9	10 mM HEPES 1.5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mM KCl gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Zellkernlysepuffer C, pH 7.9	20 mM HEPES 1.5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O

4. Materialien

	0.2 mM EDTA gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
PBS, pH 7.4	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C

Tabelle 11: Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

APS	10% Ammoniumpersulfat gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Coomassie-Blau-Färbelösung	0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 50% Methanol 10% Essigsäure 39.79% H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Elektrophoresepuffer (10x), pH 8.8	250 mM Tris-HCl 1.92 M Glycin 35 mM SDS gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Entfärbe-Lösung	10% Eisessig 20% Methanol 70% H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur
Gellösung A, Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid Lagerung bei 4°C
Gellösung B, Trenngel, pH 8.8	1.5 M Tris-HCl 14 mM SDS

4. Materialien

	gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Gellösung C, Sammelgel, pH 6.8	495 mM Tris-HCl 14 mM SDS gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
SDS-Probenpuffer (3x), pH 6.8	195 mM Tris-HCl 30% Glycerol 15% β-Mercaptoethanol 6% SDS 0.03% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 12: Puffer für Western Blot

Blockpuffer, pH 7.4	5% (w/v) Trockenmilchpulver 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS oder TBS, Lagerung bei 4°C
H ₂ O ₂ -Lösung, pH 8.5	1 M Tris-HCl 0.2% H ₂ O ₂ , Lagerung bei 4°C
Inkubationspuffer/Waschpuffer I, pH 7.4	1% (w/v) Trockenmilchpulver 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS oder TBS, Lagerung bei 4°C
Luminol-Lösung, pH 8.5	1 M Tris-HCl 250 mM Luminol, gelöst in DMSO 90 mM PCA, gelöst in DMSO, autoklaviert, Lagerung bei 4°C
TBS, pH 7.4	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Transferpuffer (10x), pH 8.3	200 mM Tris-HCl

4. Materialien

	1.5 M Glycin gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
Waschpuffer II, pH 7.4	0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS oder TBS, Lagerung bei 4°C

Tabelle 13: Puffer für Coimmunpräzipitation

Blockierungslösung, pH 7.4	10% BSA gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
EBC-Puffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 100 mM Natriumfluorid 200 µM Natriumorthovanadat 0.5% (v/v) NP 40 gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
NETN-Puffer, pH 8.0	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0.5% (v/v) NP 40 gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C

Tabelle 14: Puffer für *in vitro*-CK2 Kinaseassay

CK2 Kinasepuffer, pH 7.5	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
CK2 Reaktionsmix, pH 8.5	41.6 mM Tris-HCl 250 mM NaCl

4. Materialien

8.4 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 84 mM ATP 0.32 mM synthetisches Peptid für CK2 Sequenz: RRRDDDSDDD, wobei R für eine beliebige Aminosäure steht gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C

Tabelle 15: Puffer für Immunfluoreszenz

DAPI-Stammlösung, pH 7.4	5 µg/ml gelöst in 980 µl PBS oder H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei -20°C
Fixierlösung, pH 7.4	3.7% Formaldehyd gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Mounting Medium, pH 7.4	10% Glycerol 5% Polyvinylalkohol 25/140 gelöst in PBS, autoklaviert, Lagerung bei -20°C
Permeabilisierungslösung, pH 7.4	2% BSA 0.2% (v/v) Triton X-100 gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Waschlösung, pH 7.4	1% BSA gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C die Lösung muss frisch angesetzt werden

Tabelle 16: Puffer für “Proximity Ligation Assay” (PLA)

Waschpuffer A, pH 7.4	0.01 M Tris-HCl 0.15 M NaCl 0.05% (v/v) Tween 20 gelöst in H ₂ O _{deion.} , sterilfiltriert,
-----------------------	---

4. Materialien

	Lagerung bei 4°C
Waschpuffer B, pH 7.5	0.2 M Tris-HCl 0.1 M NaCl gelöst in H ₂ O _{deion.} , sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

Tabelle 17: Puffer für Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Sucroselösung I	45% (w/v) D (+)-Saccharose 1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
Sucroselösung II	10% (w/v) D (+)-Saccharose 1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
Sucroselösung III	5% (w/v) D (+)-Saccharose 1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C

Tabelle 18: Puffer für Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Desoxycholol (DOC)	1 mg/ml gelöst in H ₂ O _{deion.} , die Lösung muss frisch angesetzt werden
Trichloressigsäure (TCA)	50% (w/v) Trichloressigsäure gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
TCA-Probenpuffer, pH 8.8	50% 2x SDS-Probenpuffer 6% (v/v) β-Mercaptoethanol 4% (v/v) 1.5 M Tris-HCl gelöst in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 19: Stocklösungen für CK2 Inhibitoren

CX-4945 Stocklösung	10 mM CX-4945 gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
Quinalizarin Stocklösung	10 mM Quinalizarin gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
TBB Stocklösung	10 mM TBB gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C

4.11 Computerprogramme

Tabelle 20: Verwendete Computerprogramme und Internet Websites

Typ	Name	Quelle
Detektionsprogramm für DNA und Proteine	BioRad Quantity One® 1-D Analysis Software 4.6.5	BioRad, München
DNA- und Protein-Informationen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ http://uniprot.org	National Center for Biotechnology Information Uniprot
Luciferase-Assay Analyseprogramm	Tecan i-control™ 1.7	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Primerdesign	OligoAnalyzer	Integrated DNA Technologies
Bibliographieprogramm	Reference Manager 12	Adept Scientific

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die „Polymerase Chain Reaction“ ist ein häufig angewandtes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Dazu werden zwei Oligonukleotid-Primer gewählt, die gegenläufig an komplementäre DNA-Sequenzen binden und die zu vervielfältigende Sequenz einschließen [236]. Dabei werden sich thermostabile DNA-Polymerasen zu Nutze gemacht, die beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht denaturiert werden. In diesem Fall wird die Phusion[®] HF DNA-Polymerase verwendet, die eine künstlich hergestellte „Chimäre“ aus einer *Pyrococcus*-ähnlichen Polymerase und einer zusätzlich eingefügten dsDNA-bindenden Proteindomäne darstellt [1]. Neben der Polymerase werden für einen PCR-Ansatz der zu vervielfältigende DNA-Doppelstrang („Template DNA“), 5'- und 3'-Primer, Desoxyribonukleotide (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), sowie im PCR-Puffer gelöste Mg²⁺-Ionen benötigt. Der PCR-Prozess besteht aus einer gewissen Anzahl an Zyklen mit jeweils drei definierten Schritten. Im Denaturierungsschritt wird der Ansatz auf 98°C erhitzt, so dass sich die DNA-Stränge voneinander trennen. Beim anschließenden „annealing“ wird die Temperatur so gewählt, dass sich die Primer an ihre entsprechende komplementäre Sequenz der „template DNA“ anlagern. Die Wahl der Temperatur richtet sich dabei nach den verwendeten Primern und liegt 2-3°C unter dem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65°C. Die Phusion[®] HF DNA-Polymerase gilt hierbei als besonders thermostabil und kann auch bei Temperaturen über 70-72°C noch stabil DNA synthetisieren [3]. Als letztes folgt der „Elongations-Schritt“ bei 72°C, bei dem die DNA-Polymerase am jeweiligen 3'-Ende der beiden Primer mit der Anlagerung von Nukleotiden beginnt. Mit jedem Zyklus steigt die Anzahl der neu synthetisierten DNA-Sequenzen exponentiell an.

Tabelle 21: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit der Phusion[®] HF DNA-Polymerase

Komponenten	50 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	ad 50 µl	/
Phusion [®] GC 5x Reaction Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
25 µM 3' Primer	1 µl	0.2 µM

25 μM 5' Primer	1 μl	0.2 μM
Template DNA	variabel	<1 μg
Phusion-Polymerase (2 U/ μl)	0.5 μl	1 Unit

Ein Standardprotokoll für die PCR ist im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 22: Bedingungen der PCR

Reihenfolge	Temperatur	Zeit	} 35 Zyklen
1 Denaturierung der DNA	98°C	30 s	
2 Denaturierung der DNA	98°C	10 s	
3 Anlagerung der Primer	T_m Primer (°C)	30 s	
4 DNA-Synthese	72°C	15 s	
5 Vervollständigung der Synthese	72°C	15 Minuten	

5.1.2 Herstellung von Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA in einem elektrischen Feld werden verschiedenprozentige Agarosegele benötigt. Ein 1% Agarosegel wird durch Lösen und Kochen von 1% Agarose in 1x TAE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlen auf etwa 40°C wird Ethidiumbromid (EtBr) in einer Endkonzentration von 0.625 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben, um doppelsträngige DNA-Moleküle anzufärben. Danach wird die Agarose/EtBr-Lösung direkt in eine vorbereitete Gießapparatur gefüllt und unter dem Abzug erstarren gelassen.

5.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein physikochemisches Verfahren zur Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld dar und ist eine gängige Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen. Dabei bewegen sich die DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung des Phosphat-Rückgrats im elektrischen Feld durch die Poren des Agarosegels in Richtung Anode. Die Laufgeschwindigkeit hängt dabei von der Nettoladung und somit von der Größe des DNA-Moleküls ab. Kleine DNA-Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel als große DNA-Fragmente. Weitere Faktoren, die die Laufgeschwindigkeit beeinflussen,

sind die Stärke des elektrischen Feldes, sowie die Ionenstärke und die Porengröße der Agarosematrix. Letzterer Faktor kann durch die Agarosekonzentration reguliert werden.

Zur Überprüfung einer PCR oder eines Restriktionsverdaus, wird der Ansatz gelelektrophoretisch in 1%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt. Dazu wird die entsprechende DNA-Menge mit 1/5 Volumen 6x TAE-Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer erschwert zum einen die Proben, so dass diese aufgrund der höheren Dichte in die Taschen sinken, zum anderen geben die darin enthaltenen Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau Aufschluss über die Wanderstrecke der DNA im Gel. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Lauffront des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hat.

Nach der Elektrophorese wird die DNA mit dem ChemiDoc XRS der Firma BioRad detektiert. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren doppelsträngiger DNA- oder RNA-Moleküle (einzelnsträngige Nukleinsäuren werden weniger effizient gefärbt) kann durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) der Ethidiumbromid-DNA-Komplex zu einer Fluoreszenz angeregt werden, wodurch die DNA-Banden im Gel sichtbar sind.

Weiterhin kann durch die Agarosegelelektrophorese eine Größenbestimmung der DNA-Moleküle erfolgen, wenn ein Längenstandard („Marker“, „kb-Leiter“), der Fragmente bekannter Größe enthält, mitgeführt wird. Durch Vergleich der Markerbanden mit den Probenbanden kann deren Größe (und auch DNA-Gehalt) grob abgeschätzt werden. Als DNA-Marker werden die „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ und „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) verwendet.

5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen wird mittels „peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit“ (Peqlab Biotechnologie) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer sind nur käuflich erwerblich und deren Zusammensetzung dementsprechend unbekannt. Das Prinzip der Methode beruht auf der reversiblen Adsorption von DNA an die Matrix einer Säule.

Zur Reisolierung von DNA aus Agarosegelen werden die durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemachten DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wird nach Wiegen durch Zugabe von 1 ml GP-Puffer während der Inkubation für 10 Minuten bei 60°C im Heizblock gelöst. Anschließend werden 500 µl MCP-Puffer/ml GP-Puffer zugegeben, der Ansatz durch Vortexen gemischt und auf

eine „PerfectBind MicroSpin-Zentrifugensäule“ gegeben, die in einem 2 ml-Auffanggefäß steckt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 Minute, 16.000xg, RT) wird der Überstand verworfen und die an die Glasfibrermembran gebundene DNA durch zweimaliges Waschen mit 750 µl CG-Waschpuffer von Salzen und organischen Molekülen befreit. Danach wird die Säule in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und die DNA zweimal mit je 10 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert (1 Minute, 16.000xg, RT). Zur langfristigen Lagerung kann die DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

5.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentrationsmessung erfolgt mithilfe eines Spektrometers (UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience). Die entsprechende Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA und RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} erhält man eine Aussage über die Reinheit der DNA in der Lösung. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte bei DNA bei 1.8 sein und bei RNA über 1.9 liegen.

Die Messung wurde auf der Nanoquantplatte des Infinite M200 Pro (Tecan) durchgeführt und mittels der Software i-control ausgewertet.

5.1.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der in dieser Arbeit verwendeten DNAs wurden von der Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG in Kaiserslautern durchgeführt.

5.1.7 Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit dem „Zweistichproben-t-Test“ des Programms „Microsoft Office Excel“ durchgeführt. Alle Proben mit einem p-Wert ≤ 0.05 gelten hierbei als statistisch signifikant. Es gilt: * = p-Wert ≤ 0.05 , ** = p-Wert ≤ 0.01 , *** = p-Wert ≤ 0.001 .

5.1.8 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Vermehrung der gewünschten Plasmid-DNA muss diese durch eine Transformation in *E. coli* eingebracht werden. Hierzu werden 100 µl transformationskompetenter *E. coli* (siehe 5.3.1) mit 1 µg rekombinanter Plasmid-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort auf Eis wieder abgekühlt. Den Transformationsansätzen werden 800 µl

LB-Medium hinzugefügt und diese 1 Stunde bei 37°C und 550 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Ansätze abzentrifugiert, 800 µl des Überstandes verworfen und das Bakterien-Pellet in den restlichen 200 µl resuspendiert. Die Zellen können dann auf Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikumsatz ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert werden. Am nächsten Tag kann mit den gewachsenen Klonen weiter gearbeitet werden, oder die Selektionsplatten können bei 4°C gelagert werden.

5.1.9 Herstellung von Agar-Selektionsplatten

Zu 400 ml LB-Medium werden 8 g Bacto-Agar gegeben und die Lösung anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf circa 55°C wird die sterilfiltrierte Antibiotikum-Stammlösung hinzugegeben. Die Konzentration in den Selektionsplatten beträgt 50 µg/ml für Ampicillin. Die 100-mm-Platten werden mit der Agarlösung circa 0.5 cm hoch gefüllt und bei 4°C gelagert.

5.1.10 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Nucleobond®AX-plasmid-purification kit

Bei dieser Methode muss die Plasmid-DNA vor der Isolation erst propagiert werden. Dazu wird ein Klon von einer Selektionsplatte in 200 ml LB-Medium überimpft, das zuvor mit einem Selektionsantibiotikum versetzt wurde. Die Suspension wird über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag werden die Bakterien bei 4°C und 6.000xg für 15 Minuten abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird mithilfe des „NucleoBond plasmid purification kits“ (Midi-Prep) isoliert. Das Pellet wird zu Beginn in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase) resuspendiert. Zu dieser Suspension werden anschließend 4 ml Lösung S2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) gegeben, 5-6x invertiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 4 ml gekühlter Puffer S3 (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) zugegeben, die Suspension wieder vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension filtriert, um genomische DNA und Zelltrümmer abzutrennen. Das Filtrat wird hierzu auf eine Nucleobond-Säule gegeben, die zuvor mit 2.5 ml Puffer N2 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, 0.15% Triton X-100, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) äquilibriert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml Puffer N3 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) wird die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer N5 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8.5 mit H₃PO₄ eingestellt) in ein silanisiertes Corex Röhrchen eluiert. Durch Zugabe von 3.5 ml reinem Isopropanol wird die DNA gefällt und durch

Zentrifugation bei 4°C und 13.000xg für 30 Minuten abgetrennt. Die gefällte DNA kann dann an der Luft getrocknet und in sterilem H₂O_{deion.} aufgenommen werden.

5.2 Zellkulturtechniken

5.2.1 Kultivieren von Zellen

Die in der Arbeit verwendete pankreatische β -Zelllinie INS-1 wird in RPMI1640 (11 mM Glucose) mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 50 μ M β -Mercaptoethanol bei konstanten 37°C, sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit (rH) und einem CO₂-Gehalt von 5% in entsprechenden Kulturschalen kultiviert.

5.2.2 Passagieren von Zellen

Für das Umsetzen der Zellen wird zunächst das Medium abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen folgt daraufhin eine Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) für etwa 2-5 Minuten bei 37°C/5% CO₂/95% rH. Der Chelatbildner Ethylendiaminotetraacetat (EDTA; 0.25%) bindet in dieser Zeit die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca²⁺-Ionen; die Protease Trypsin (0.1%) hingegen sorgt währenddessen für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband durch Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden. Nach dem Ablösen wird der Zellsuspension anschließend frisches Kulturmedium zugesetzt und die Zellen können in einem neuen Kulturgefäß ausgesät werden (Passage). Alle Zellkulturarbeiten werden dabei unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

5.2.3 Tauen von Zellen

Die Zellen werden in einem 37°C warmen Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und anschließend in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Durch langsame, tropfenweise Zugabe des 10-fachen Volumens an eiskaltem Zellkulturmedium ohne FCS wird die Zellsuspension verdünnt. Die Zellen werden 7 Minuten bei 253xg und 4°C abzentrifugiert, das Sediment in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

5.2.4 Einfrieren von Zellen

Säugerzellen lassen sich in flüssigem Stickstoff einfrieren und über längere Zeit lagern. Zum Einfrieren werden die Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Kulturschale mit Trypsin abgelöst, im entsprechenden Medium aufgenommen und für 7 Minuten bei 4°C und 253xg

zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 0.5 ml eiskaltem Zellkulturmedium mit 40% FCS resuspendiert. Danach werden unter ständigem Schütteln auf Eis 0.5 ml Medium mit 20% DMSO tropfenweise zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und für 2 Stunden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff inkubiert. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff über Monate gelagert werden.

5.2.5 Ernten von Zellen

Zur Herstellung von Zellpellets wird das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen dreimal mit kaltem 1x PBS (pH 7.4) gewaschen und unter zur Hilfenahme eines Zellschabers von der Gewebeskulturschale gelöst. Im Anschluss werden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 253xg für 7 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird entweder sofort weiterverarbeitet, oder bei -20°C gelagert.

5.2.6 Beseitigung von Kontaminationen

Bakterielle Kontaminationen werden, nach vorangegangenem mehrmaligen Waschen mit Medium, durch die Zugabe von 10 µl Penicillin/Streptomycin (10.000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) pro ml Zellkulturmedium beseitigt. Bei schweren Kontaminationen durch Bakterien werden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert, in 5 ml serumfreiem Medium in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 7 Minuten bei 4°C und 253xg abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen auf eine neue Schale, unter Antibiotikazugabe, ausgesät. Hefe- und Pilzkontaminationen werden mit 10 µl Amphotericin B (250 µg/ml) pro ml Zellkulturmedium behandelt.

5.2.7 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet (Kammerfaktor = 104). Frisch abgelöste Zellen werden in 1-2 ml Kulturmedium aufgenommen. 10 µl dieser Suspension werden mit 90 µl Trypanblau gemischt, um tote Zellen anzufärben. Die Suspension wird zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Ausgezählt werden jeweils die äußeren 4 Quadrate. Nach Berechnung des Mittelwerts für ein Quadrat ergibt sich durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor 10 die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

5.2.8 Transiente Transfektion von Zellen

Transfektion bedeutet das gezielte Einbringen von DNA, speziell von Expressionsvektoren in eukaryotische Zellen. Genauso wie bei der Transformation, muss die DNA die Zellmembran passieren. Im Zellkern wird die Information der DNA in RNA umgesetzt, und es kann zu einer Expression der im Vektor kodierten Gene kommen. In den Experimenten wird die Transfektion mit „Turbofect[®] Transfection Reagent“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot), oder mit „ViaFect[™] Transfection Reagent“ (Promega, Mannheim) durchgeführt.

Für eine Transfektion werden am Vortag auf eine ausgewählte Zellkulturplatte INS-1-Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 70-90% konfluent gewachsen sind. Zur Transfektion wird dann die entsprechende DNA-Menge (siehe Tabelle 23 und 24) in serumfreiem Medium mit dem Transfektionsreagenz gemischt und für 10 Minuten (ViaFect[™]), oder 20 Minuten (Turbofect[®]) bei RT inkubiert. Anschließend wird die Mischung in serumfreiem Medium auf die Zellen gegeben und diese bis zu einem gewünschten Zeitpunkt bei 37°C, 95% rH und 5% CO₂ weiter inkubiert.

Tabelle 23: Transfektionsansätze für die Transfektion mit Turbofect[®] Transfection Reagent

Kulturformat	Turbofect [®] Reagenz (µl)	DNA (µg)	Kultivierungsmedium (ml)	Serum-freies Medium (ml)
24-Lochplatte	2	1	1	0.1
6-Lochplatte	6	4	2	0.4
60-mm Schale	12	6	3	0.6
100-mm Schale	20	10	5	1

Tabelle 24: Transfektionsansätze für die Transfektion mit ViaFect[™] Transfection Reagent

Kulturformat	ViaFect [™] Reagenz (µl)	DNA (µg)	Kultivierungsmedium (ml)	Serum-freies Medium (ml)
24-Lochplatte	1.5	0.5	1	0.05
6-Lochplatte	7.5	2.5	2	0.25
60-mm Schale	15	5	3	0.5

5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden

5.3.1 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wird nach dem Protokoll von Hanahan [91] durchgeführt. Dazu werden 50 µl Bakterien in 20 ml TYM-Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, 2 g MgSO₄, pH 7.3) bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte OD_{600nm} = 0.5 erreicht ist. Man verdünnt die Bakterienkultur auf 100 ml mit TYM-Medium bis zum erneuten Erreichen der oben genannten OD, um die 100 ml Kultur abschließend auf 500 ml zu verdünnen. Beim Erreichen einer OD_{600nm} = 0.6 wird die Bakterienkultur durch Schütteln in einem NaCl-Eiswasserbad rasch abgekühlt und dann bei 4.000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Man resuspendiert das Bakterienpellet in 100 ml eiskaltem TfbI-Puffer (100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerol) und zentrifugiert erneut. Das Pellet wird in 20 ml kaltem TfbII-Puffer (75 mM CaCl₂, 10 mM Na-MOPS, 10 mM KCl, 15% Glycerol, pH 7.0) aufgenommen, in 200 µl Schritten in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgt bei -80°C.

5.3.2 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse

5.3.2.1 Herstellung von Gesamtzelextrakten

Die Zellen werden wie unter 5.2.5 beschrieben geerntet. Das Pellet wird in doppeltem Volumen Ripa- oder Sigma-Lysepuffer aufgenommen und mit dem Protease-Inhibitor CompleteTM (1:25) 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 16.000xg zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand kann einer Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 5.3.4) unterzogen werden und zur Lagerung kurzfristig bei -20°C oder längerfristig bei -80°C aufbewahrt werden.

5.3.2.2 Herstellung von Zellkern- und Cytoplasmaextrakten

Um Zellkern- und Cytoplasmaextrakte aus Zellen zu erhalten, werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen (15 Minuten, 1.400xg, 4°C) und anschließend in Zelllysepuffer A (1 ml/10⁷ Zellen) mit zugesetztem Proteaseinhibitor (CompleteTM 1:25) und 0.5 mM DTT 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 15 s Invertieren wird die Zellkernfraktion 15 Minuten bei 1.400xg und 4°C abzentrifugiert. Der erhaltene cytoplasmatische Überstand kann abgenommen und entweder direkt für eine nachfolgende Analyse eingesetzt oder zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden. Um die pelletierten Zellkerne weiter aufzuschließen, werden diese in Zellkernlysepuffer C (0.25 ml/10⁷ Zellen) mit zugesetztem Proteaseinhibitor

(Complete™ 1:25) und 0.5 mM DTT resuspendiert und nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration 450 mM) 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird mindestens 5x zuerst durch eine 21 G-Kanüle und anschließend mindestens 5x durch eine 23 G-Kanüle gepresst, bevor eine dreißigminütige Zentrifugation bei 16.000xg und 4°C folgt. Der so erhaltene Überstand, der die Zellkernfraktion enthält, kann einer Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 5.3.4) unterzogen werden, oder zur Lagerung kurzfristig bei -20°C, oder längerfristig bei -80°C aufbewahrt werden.

5.3.3 Herstellung von Extrakten aus Gewebestücken

5.3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Gewebestücken

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus primärem Gewebe, wird das Gewebestück in flüssigem Stickstoff bis zur Pulverform gemörsert. Anschließend wird das entstandene Pulver zügig in Sigma-Lysepuffer mit zugesetztem Proteaseinhibitor (Complete™ 1:25) aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, wobei das Volumen an Puffer etwa dem doppelten Volumen des Gewebeteilchens entspricht. Nach einstündiger rollender Inkubation des gelösten Gewebematerials bei 4°C, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 16.000xg und 4°C, kann der erhaltene Überstand für eine Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt werden.

5.3.3.2 Herstellung von Zellkern- und Cytoplasmaextrakten aus Gewebestücken

Zur Herstellung von Zellfraktionen (Zellkern/Cytoplasma) aus primärem Gewebe, wird das Gewebestück in Zelllysepuffer A mit zugesetztem Proteaseinhibitor (Complete™ 1:25) und 0.5 mM DTT aufgenommen und 15x gepottert. Anschließend wird die Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert und analog 5.3.2.2 weiter aufgeschlossen.

5.3.4 Proteinquantifikation nach Bradford

Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes einer Lösung erfolgt meist mithilfe von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen und kann mit einem Photometer gemessen werden. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford nutzt man die Farbreaktion, die dadurch entsteht, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) im sauren Milieu mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird

der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes wird in Anwesenheit von Proteinen und im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm verschoben und kann photometrisch vermessen werden. Die Bestimmung des Proteingehaltes wird mit dem „Proteinassay Kit“ von BioRad vorgenommen. Dazu wird je 1 µl des Zellextraktes zu 800 µl H₂O_{deion.} und 200 µl Bradfordreagenz pipettiert und nach 5 Minuten die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert aus H₂O_{deion.} und Bradfordreagenz gemessen. Der Proteingehalt kann mithilfe einer BSA-Eichkurve berechnet werden.

5.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist in der biochemischen Analytik eines der am häufigsten angewandten Verfahren zur Trennung von Proteinen. Dabei wandern die Proteine im elektrischen Feld durch die Polyacrylamidmatrix. Die Trennung der Proteine ergibt sich aus den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine. Diese sind abhängig von der Größe, der Form und der Ladung des jeweiligen Proteins.

Eine häufig verwendete Variante der „PAGE“ ist die von Shapiro *et al.* eingeführte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [258]. Dabei erfolgt die Trennung der Proteine nur aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte. SDS ist ein anionisches Detergenz, das aus einem langen hydrophoben Teil und einem Sulfatrest besteht. Für die „SDS-PAGE“ werden die Proteine in Anwesenheit von SDS hitzedenaturiert, wobei sich der hydrophobe Teil des SDS an hydrophobe Aminosäurereste der Proteine anlagert und so Mizellen bildet. Durch Erhitzen der Proteinprobe auf 95°C und dadurch bedingtes Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen, werden zudem Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört. Zur vollständigen Denaturierung wird zusätzlich das reduzierende Agens β-Mercaptoethanol zugegeben, um Disulfidbrückenbindungen der Proteine aufzubrechen. Durch die Interaktion der Proteine mit SDS erhalten diese nahezu die gleiche (negative) Ladung und wandern im elektrischen Feld je nach Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Die Wanderungsstrecke im elektrischen Feld entspricht dem Logarithmus der Molmasse des Proteins.

Polyacrylamidgele entstehen durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und der Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet, wobei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator der Reaktion dient. Durch die Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid kann die Porengröße der Gelmatrix, je nach Größe der zu trennenden Proteine, variiert werden.

Vor dem Zusammenbau der Gelkammer werden alle Bestandteile sorgfältig gereinigt, um eventuellen Verunreinigungen des Gels vorzubeugen. Die Kammer wird zu 75% mit dem Trenngel gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wird das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und die Kämme werden in die Gelkammern gesteckt. Ist das Sammelgel auspolymerisiert, können die Gele in einer feuchten Verpackung bei 4°C für mehrere Tage aufbewahrt werden.

Für beide Gele wird eine gebrauchsfertige Acrylamid-Stammlösung (Lösung A) mit 30% (w/v) Acrylamid und 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid der Firma Carl Roth GmbH & Co. verwendet. Für das Trenngel wird die Pufferlösung B, für das Sammelgel die Pufferlösung C zugesetzt. Das Pipettierschema für die Herstellung verschiedenprozentiger SDS-Polyacrylamidgele ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der verschiedenen SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel (%)	7.5	10	12.5	15	20	Sammelgel (%)	4.3
Lösung A (ml)	9	12	15	18	24	Lösung A (ml)	2.2
Lösung B (ml)	9	9	9	9	9	Lösung C (ml)	3.8
Wasser (ml)	18	15	12	9	3	Wasser (ml)	9
APS (µl)	200	200	200	200	200	APS (µl)	100
TEMED (µl)	20	20	20	20	20	TEMED (µl)	40

Nachdem das SDS-Polyacrylamidgel fertig gegossen ist, kann es in die Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small eingespannt und mit Elektrophoresepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.92 M Glycin, 35 mM SDS) befüllt werden. Die Proteinproben, sowie ein Proteingrößenstandard, werden in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert, sodass die elektrophoretische Trennung der Proteine bei 25 Milliampère pro Gel für circa 1.5 Stunden erfolgen kann.

5.3.6 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine können durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Gel für 20 Minuten in der Coomassie-Blau-Färbelösung (0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250, 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250, 50% Methanol, 10% Eisessig, 39.79% H₂O_{deion.}) fixiert, gefärbt, und anschließend in einem Gemisch aus 10% Eisessig, 20% Methanol und 70% H₂O_{deion.} entfärbt, sodass die Proteinbanden deutlich sichtbar werden.

5.3.7 Western Blot Analyse

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine werden im Tank-Blot-System auf eine PVDF-Membran (Roche, Mannheim) geblottet.

Die Blotapparatur wird für den Proteintransfer wie folgt zusammengebaut:

- Schwamm
- 3 Blatt Filterpapier 3MM
- PVDF-Membran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 3 Blatt Filterpapier 3MM
- Schwamm

Schwamm und Whatman-Papier werden in Transferpuffer und die PVDF-Membran in Methanol getränkt. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die im SDS-Polyacrylamidgel befindlichen Proteine nun aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode und werden damit auf die PVDF-Membran transferiert und immobilisiert.

Der Transfer wird bei 200 mA in 4 Stunden oder über Nacht bei 110 mA vorgenommen.

5.3.8 Immunologischer Proteinnachweis

Auf eine PVDF-Membran geblottete Antigene lassen sich mit Antikörpern nachweisen. Zuerst wird der Blot für 1 Stunde in einem Blockpuffer bestehend aus 1x PBS oder 1x TBS (pH 7.4) mit 0.1% Tween 20 und 5% Trockenmilchpulver geblockt. Durch das Blocken werden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Danach wird der Blot für 1-2 Stunden oder über Nacht mit einem Primärantikörper (verdünnt in Inkubationspuffer (1x PBS/TBS (pH 7.4)) mit 0.1% Tween 20 und 1% Trockenmilchpulver)) inkubiert. Nach der Inkubation wird der Blot zweimal je 10 Minuten mit Waschpuffer I (1x PBS/TBS (pH 7.4), 0.1% Tween 20) gewaschen, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Sekundärantikörper gegen Kaninchen und Maus werden in Inkubationspuffer mit 0.1% Tween 20 und 1% Trockenmilchpulver für eine Stunde eingesetzt. Nach zweifachem Waschen in Waschpuffer II (1x PBS/TBS, 0.1% (v/v) Tween 20) für je 10 Minuten kann der Blot entwickelt werden. Der Antikörper-gekoppelte Peroxidasenachweis erfolgt in einer Reaktion mit Luminol und H_2O_2 . Dazu wird die Membran mit einem 1:1-Gemisch aus 1 ml Luminol- und 1 ml H_2O_2 -Lösung benetzt und die Chemilumineszenz und die Quantifizierung mit der Software Quantity One 4.6.5 im ChemiDoc XRS-System dokumentiert. Zur Lagerung werden die Membranen kurz in Methanol geschwenkt, getrocknet und zwischen Filterpapieren bei 4°C aufbewahrt.

5.3.9 Coimmunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung eines bestimmten Antigens aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung. Ermöglicht wird dies durch die reversible Bindung der Fc-Domäne des Antikörpers an Protein-A- oder G-Sepharose. Unter physiologischen Pufferbedingungen ist es auch möglich, weitere an das präzipitierte Protein gebundene Proteine zu präzipitieren (Coimmunpräzipitation). Im Präzipitat werden dann die Antigene über ihr Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel bestimmt. Die Inkubationsschritte der Immunpräzipitation werden bei 4°C durchgeführt und alle Lösungen und Puffer müssen ebenfalls auf 4°C vorgekühlt sein. Die entsprechenden Zellen werden wie in Punkt 5.3.2.1 oder 5.3.2.2 geerntet und der Überstand einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen. Pro Präzipitation werden 30-60 µl 50%-Sepharosegemisch aus Protein-A- oder G-Sepharose und CL-4B-Sepharose (Verhältnis 1:3) eingesetzt. Die Sepharose CL-4B dient lediglich der Volumenvergrößerung. Nachdem die Sepharose 2x mit PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen und zur Verringerung der unspezifischen Bindungen insgesamt 1 Stunde mit PBS + 10% BSA vorgeblockt wurde, wird diese in 5 gleichen Teilen in Eppendorfgefäße aufgeteilt (1. Vorpräzipitat, 2. Vorpräzipitat, Immunpräzipitat, Antikörperkontrolle, Sepharosekontrolle). Zur Coimmunpräzipitation von CK2 an USF werden alle Ansätze statt mit PBS analog mit EBC-Puffer (50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 100 mM Natriumfluorid, 200 µM Natriumorthovanadat, 0.5% (v/v) NP 40) gewaschen oder inkubiert. Die entsprechende Menge des Zell- oder Zellkernextrakts (1-2 mg) wird nun zu der Sepharose des 1. Vorpräzipitats gegeben, das Reaktionsgefäß mit der Sepharose für das 2. Vorpräzipitat wird weiterhin mit PBS und 10% BSA inkubiert, während die für die Immunpräzipitation vorgesehene Sepharose mit PBS + 10% BSA, sowie dem jeweiligen zu präzipitierenden Antikörper versehen wird (1.5 µg monoklonaler bzw. polyklonaler Antikörper/500 µg Extrakt bzw. 20 µl gereinigtes Kaninchen-Serum). Alle Ansätze werden 1 Stunde unter Rollen bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wird das 2. Vorpräzipitat zweimal mit PBS bzw. EBC-Puffer gewaschen, bevor der nach Zentrifugation des 1. Vorpräzipitats erhaltene Überstand auf die 2. Vorpräzipitat-Sepharose übertragen wird. Die Sepharose für das 2. Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat werden erneut 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wird die Immunpräzipitat-Sepharose, zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper, zweimal mit PBS bzw. EBC-Puffer gewaschen, bevor der nach Zentrifugation des 2. Vorpräzipitats erhaltene Überstand auf das Immunpräzipitat übertragen wird. Die Inkubation mit der Antikörper gebundenen Sepharose erfolgt für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend werden alle Proben 4x mit PBS gewaschen, mit

30 µl 3x SDS-Probenpuffer (195 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 6% SDS, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) versehen, gekocht und mit den Kontrollproben wie Zell- bzw. Zellkernextrakt, Überstand, Immunpräzipitat, Antikörperkontrolle und Sepharosekontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Coimmunpräzipitation von CK2 an USF, werden alle Ansätze vor dem Kochen 4x mit NETN-Puffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) NP 40) statt mit PBS gewaschen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung werden die Proteinproben auf eine PDVF-Membran geblottet, so dass copräzipitierte Proteine mit einem spezifischen Antikörper auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden können.

5.3.10 *In vitro*-CK2-Kinaseassay

Die enzymatische Aktivität der Proteinkinase CK2 wird über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$) in ein synthetisches Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD gemessen, dessen Serin durch CK2 phosphoryliert werden kann [167]. Die Menge des eingebauten Phosphats wird über die Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Nachdem die Zellen geerntet, in Ripa- oder Sigma-Lysepuffer aufgeschlossen und der Proteingehalt bestimmt wurde, werden 30 µg Protein in 20 µl CK2 Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$) aufgenommen. Es werden 30 µl CK2-Mix (10 µCi/500 µl ^{32}P -γ-ATP oder ^{32}P -γ-GTP und CK2 Reaktionsmix: 25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 50 µM ATP, 0.19 mM (Endkonzentration) synthetisches Peptid für CK2) hinzupipettiert. Die Lösung wird 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gelagert. 30 µl der Probe wird auf Whatman P81 Ionenaustausch-Filterpapier übertragen, welches das Peptidsubstrat bindet. Das Whatman Papier wird 3x für je 5 Minuten mit 85 mM Phosphorsäure gewaschen. Es folgt ein fünfminütiger Waschschriff mit technischem Ethanol, um nicht in das Peptid eingebautes Phosphat zu entfernen. Das Filterpapier wird unter Rotlicht getrocknet und anschließend in ein Szintillationsröhrchen überführt. Mithilfe der Čerenkov-Strahlung kann im Szintillationszähler die Aktivität der Probe gemessen werden. Für jede Probe wird eine Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kontrollen werden eine Negativ-Kontrolle (20 µl CK2 Kinasepuffer) und eine Positiv-Kontrolle (18 µl CK2 Kinasepuffer mit 2 µl CK2-Holoenzym) mitgeführt.

5.3.11 Phosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen

Phosphorylierungen können auch mit immunpräzipitierten bzw. coimmunpräzipitierten Proteinen untersucht werden. Dazu wird das entsprechende Protein analog Punkt 5.3.9 präzipitiert und die Reaktion nach Waschen durch Zugabe von 5 μCi [^{32}P]- γ -ATP oder [^{32}P]- γ -GTP in 20 μl CK2 Kinasepuffer/Ansatz gestartet. Hierbei kann das Präzipitat vorab gleichmäßig in mehrere Ansätze aufgeteilt und diese mit verschiedenen CK2-Hemmstoffen oder rekombinantem CK2-Holoenzym versehen werden. Die Ansätze werden nun über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln (750 rpm) inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Inkubation auf Eis gestoppt und alle Ansätze mindestens 8x mit PBS gewaschen. Nachfolgend werden 30 μl 3x SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben bei 95°C für 10 Minuten denaturiert. Die Proteine werden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und autoradiographisch analysiert. Nach Abklingen der Radioaktivität kann ein immunologischer Proteinnachweis per Western Blot Analyse angeschlossen werden.

Alternativ kann nach der Immunpräzipitation auch ein *in vitro*-CK2-Kinaseassay analog Punkt 5.3.10 angeschlossen werden.

5.3.12 *In vivo*-Phosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen

Um phosphorylierte Proteine innerhalb ihres zellulären Umfelds, und somit *in vivo* zu analysieren, können diese mit [^{32}P]-Orthophosphorsäure inkubiert werden. Durch Zugabe von radioaktiv-markiertem Phosphat nutzen in phosphatfreiem Medium gehungerte Zellen das frisch zugegebene Nukleotid für zelluläre Syntheseprozesse und können dieses so z.B. für posttranslationale Modifikationen wie Proteinphosphorylierungen verwenden. Diese können dann anschließend quantitativ mittels Autoradiographie detektiert werden.

Zur Durchführung der *in vivo*-Phosphorylierung werden Zellen in 100-mm-Kulturschalen 3x mit phosphatfreiem Medium (+ entsprechende Mediumzusätze) gewaschen, bevor diese für 2 Stunden in selbigem Medium bei 37°C/5% CO_2 /95% rH gehungert werden. Zur radioaktiven Phosphat-Markierung werden die Zellen anschließend für 4 Stunden mit 100 μCi [^{32}P]-Orthophosphorsäure in phosphatfreiem Medium (+ entsprechende Mediumzusätze) bei 37°C/5% CO_2 /95% rH inkubiert, wobei die Schalen gelegentlich kurz geschwenkt werden. Die entsprechenden Zellen werden wie in Punkt 5.3.2.1 mit Ripa-Lysepuffer (mit Complete[®] 1:25 und PhosSTOP 1:10) geerntet und der Überstand einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen. 1-2 mg Zellextrakt werden für eine anschließende Immunpräzipitation analog Punkt 5.3.9 eingesetzt und alle Proben abschließend 10x mit PBS gewaschen, mit

30 µl 3x SDS-Probenpuffer (195 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% Glycerin, 15% β -Mercaptoethanol, 6% SDS, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) versehen, gekocht und mit den Kontrollproben wie Zellextrakt, Überstand, Vorpräzipitat, Antikörperkontrolle und Sepharosekontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, können die radioaktiv-markierten Proteine zuerst autoradiographisch und nach Abklingen der Radioaktivität immunologisch mit entsprechenden Antikörpern visualisiert werden.

5.3.13 Autoradiographie

Radioaktiv-markierte Proteine werden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wird anschließend für circa 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Nachfolgend können die radioaktiv-markierten Proteine mittels Röntgenfilm autoradiographisch detektiert und quantifiziert werden.

Radioaktiv-markierte Proteine können auch mithilfe von Phosphorimaging-Platten autoradiographisch detektiert und quantifiziert werden. Nach Trocknung wird eine Phosphorimaging-Platte (GE Healthcare, München) für mehrere Stunden oder Tage aufgelegt, welche in diesem Zeitraum β -Strahlen absorbiert. Diese Strahlen regen Moleküle auf der Platte an, die dann in einen angeregten Zustand übergehen, bis der Phosphorimager die Platte mit einem Laser scannt. Die bis dahin von der Platte eingeschlossene β -Strahlung wird nun freigesetzt und kann am Computer detektiert werden. Dabei entsteht ein schwarz-weiß gefärbtes Bild, bei dem die verschiedenen Graustufen die Stärke der Radioaktivität widerspiegeln [2].

5.3.14 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Für Immunfluoreszenzstudien werden Zellen auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 50-70% kultiviert. Für die Antikörperfärbung werden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen aus den Kulturschalen entnommen, 5x kurz in PBS gewaschen und 15 Minuten in PBS + 3.7% Formaldehyd fixiert. Danach werden die Zellen 3x 10 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und durch Inkubation in PBS + 2% BSA und 0.2% (v/v) Triton X-100 5 Minuten auf Eis unter Schütteln permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen 3x 10 Minuten in PBS + 1% BSA gewaschen, bevor die Inkubation mit den primären Antikörpern in PBS + 1% BSA in einer feuchten Kammer für eine halbe Stunde bei 37°C, oder über Nacht bei 4°C erfolgt. Für die Zellen, die der Kontrolle des sekundären Antikörpers dienen, erfolgt eine Inkubation in PBS + 1% BSA. Im Anschluss erfolgt ein erneuter

Waschschritt mit PBS (3x 10 Minuten). Nach Zugabe des sekundären Fluorophor-konjugierten Antikörpers für eine halbe Stunde bei 37°C in PBS + 1% BSA in einer feuchten, dunklen Kammer, werden die Zellen unter denselben Bedingungen, wie zuvor, gewaschen. Zudem wird eine Zellkernfärbung mit DAPI (5 µg/ml DAPI-Stammlösung in 980 µl PBS, pH 7.4) für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Waschen in PBS (3x 5 Minuten) werden die Zellen einmal kurz in H₂O_{deion.} gespült, bevor sie in einem Tropfen Mounting Medium (10% Glycerol, 5% Polyvinylalkohol 25/140, pH 7.4) aufgenommen und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden.

5.3.15 „Proximity Ligation Assay“ (PLA)

Der „Proximity Ligation Assay“ ist eine Methode zur Untersuchung der Lokalisierung, sowie direkten Protein-Protein Interaktion in einzelnen Zellen. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass zunächst 2 primäre Antikörper unterschiedlicher Spezies ihr Target-Protein in der Zelle erkennen. Erkannt werden darauffolgend diese primären Antikörper von Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern, auch PLA Proben genannt, jeder mit einem kurzen Oligonukleotid gekoppelt, komplementär zu der zweiten verwendeten PLA Probe (PLA Probe MINUS und PLA Probe PLUS). Befinden sich die PLA Proben in räumlicher Nähe zueinander, kommt es zur Interaktion und Verbindung der beiden Oligonukleotide durch enzymatische Ligation. Durch Zugabe einer Amplifikationslösung, welche zusätzlich Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide enthält, entsteht durch „rolling circle amplification“ eine fluoreszierende Verbindung beider Proteine, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie als roter Spot sichtbar gemacht werden kann.

Zur Durchführung des PLA wachsen die Zellen in 60-mm-Kulturschalen auf Deckgläschen bis die Kultur zu etwa 80% konfluent ist. Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen 5x kurz in PBS gespült, bevor sie 3x 10 Minuten ebenfalls in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen werden. Anschließend erfolgt die Fixierung in PBS + 3.7% Formaldehyd bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Es schließen sich 3 Waschschritte in PBS an. Die Permeabilisierung der Zellen wird mit PBS + 2% BSA + 0.2% (v/v) Triton X-100 für 5 Minuten unter Schütteln auf Eis vorgenommen. Es folgen 3 Waschschritte für je 10 Minuten in PBS + 1% BSA zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Es schließt sich die Inkubation mit dem Primärantikörper gelöst in PBS + 1% BSA für 30 Minuten bei 37°C, oder über Nacht bei 4°C an. Eine Probe wird als Negativkontrolle statt mit dem Primärantikörper mit PBS + 1% BSA behandelt. Danach werden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen und es schließt sich die Inkubation mit den PLA Proben als Sekundärantikörper an. Dazu

werden die beiden Spezies-spezifischen PLA Proben 1:5 in PBS mit BSA (1%) verdünnt und vor dem Gebrauch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit den PLA Proben folgen 2 Waschschrte in Waschpuffer A (0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) für je 5 Minuten. Für den anschließenden Ligationsschritt wird zunächst der Ligasestock 1:5 in H₂O_{deion.} verdünnt und unmittelbar vor Gebrauch mit der Ligase (1:40) versehen. Die Inkubation der Zellen mit der Ligaselösung erfolgt für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. In der Zwischenzeit wird die Amplifikationslösung durch Verdünnen des Stocks 1:5 in H₂O_{deion.} hergestellt. Auch hier ist darauf zu achten, dass die Polymerase (1:80) erst unmittelbar vor Gebrauch zu der Lösung pipettiert wird. Nach 2x zweiminütigem Waschen der Zellen in Waschpuffer A kann die Inkubation mit der Amplifikationslösung in einer feuchten Kammer bei 37°C für 100 Minuten erfolgen. Die Inkubation muss im Dunkeln erfolgen, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Im Anschluss werden die Zellen 2x 10 Minuten in Waschpuffer B (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl), sowie nachfolgend 1 Minute in 0.01x Waschpuffer B gewaschen. Nach dem Trocknen der Zellen auf den Deckgläschen erfolgt das Eindecken in Mounting Medium mit DAPI. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten erfolgt die Analyse der Präparate mittels Mikroskopie. Um die Präparate auch noch nach einigen Tagen betrachten zu können, werden sie mit farblosem Nagellack umschlossen und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

5.3.16 Luciferase-Assay

Reportergene werden in der Biologie zur Analyse der Genexpression eingesetzt und geben so zum Beispiel Aufschluss über die Aktivität des Promotors der zu untersuchenden Gene. Der Luciferasereporterassay ist im Vergleich zu herkömmlichen Methoden zum einen sehr empfindlich, und zum anderen einfach durchzuführen. Da es sich bei der Luciferase um ein monomeres Protein handelt, das keinerlei posttranslationale Prozessierung zur enzymatischen Aktivität benötigt, kann es sofort nach der Translation als Reporter fungieren. In der vorliegenden Arbeit wird die *Firefly*-Luciferase verwendet, welche das Substrat Luciferin in Oxyluciferin umsetzt, wodurch ATP und O₂ zu AMP + PP_i und CO₂ umgesetzt werden und die Lichtemission bei $\lambda = 560$ nm gemessen werden kann. Gewöhnlich ist der Lichtimpuls klein und muss mit einem empfindlichen elektronischen Apparat, wie einem Luminometer, detektiert werden. Die Lichtintensität ist ein Maß der Enzymaktivität der Luciferase und ist deshalb abhängig von der Temperatur. Das Temperaturoptimum für die Luciferase liegt bei Raumtemperatur (20-25°C). Die *Firefly*-Lumineszenzwerte werden auf die Proteinmengen normiert und die so erhaltenen Werte als relative Lichteinheiten (RLU) bezeichnet. Dabei

korrelieren diese mit der vorhandenen Menge an Luciferase und geben so eine Aussage über die Aktivität des zu untersuchenden Reportergenkonstrukts.

Die Durchführung des Luciferase-Assays erfolgt mit dem Luciferase-Assay-System. Dazu werden Zellen in den Vertiefungen einer 24-Loch- oder 6-Loch-Platte ausgesät, mit dem Reporter sowie der zu transfizierenden DNA versehen und am nächsten Tag für einen entsprechenden Zeitraum mit verschiedenen Teststimuli kultiviert. Danach wird das Medium der Zellen abgesaugt und pro Ansatz 100 µl (24-Loch) oder 200 µl (6-Loch) 1x Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Die Platte wird im Anschluss 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, bevor die einzelnen Reaktionsansätze in 1.7 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 16.000xg 1 Minute zentrifugiert werden. Vom Überstand wird eine Proteinbestimmung durchgeführt und die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgt mit dem LuciferaseTM Reporter Assay System am Luminometer Infinite M200 Pro von Tecan. Hierzu werden 20 µl des transfizierten Zelllysates pro Kavität in einer weißen 96-Well-Platte vorgelegt und diese ins Infinite M200 Pro gestellt. Dort werden automatisch 50 µl des *Firefly*-Luciferase-Reagenzes (Luciferase-Assay-System) pro Kavität zugegeben und die Lichtreaktion initiiert. Nach 2 Sekunden Wartezeit wird die Intensität der *Firefly*-Luciferasereaktion im ersten Well für 10 Sekunden gemessen. Die gemessene Lichtemission korreliert hierbei mit der vorhandenen Menge an Luciferase. Je Ansatz wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die relativen Luciferase-Messeinheiten der eingesetzten Zellextrakte werden im Anschluss auf gleiche Proteinmengen und Mengen an cotransfiziertem Expressionsplasmid bezogen.

5.3.17 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Die Detektion des Insulingehaltes im Medium von Zellen erfolgt mit dem Rat/Mouse Insulin ELISA-Kit von Millipore. Zur Durchführung wird zunächst das Medium der entsprechend behandelten Zellen entnommen und 1:10 verdünnt. Neben den Mediumproben müssen zur Sicherstellung der Richtigkeit des Assays zusätzlich 2 Qualitätskontrollen (QC1 und QC2) sowie Insulinstandards von 0.2 ng/ml bis 10 ng/ml, welche im Kit enthalten sind, mitgeführt werden. Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platten mit Waschpuffer werden die Kavitäten, in welche die Mediumproben zur Insulinbestimmung kommen mit je 10 µl Assay-Puffer beladen, wohingegen diejenigen, welche für die QC1 und QC2, sowie die Insulinstandards vorgesehen sind, mit 10 µl Matrix-Lösung beschichtet werden. Im Anschluss werden die entsprechenden Kavitäten jeweils in Doppelbestimmung mit den Insulinstandards, den QC- bzw. den Mediumproben versehen (jeweils 10 µl). Im Anschluss werden 80 µl Detektions-Antikörper zu allen Proben pipettiert, die Kavitäten mit einer Plastikfolie

verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 450 rpm inkubiert. Danach werden die Proben in den ELISA-Kavitäten dreimal gewaschen. Dann erfolgt die Zugabe von 100 µl Enzymlösung zu allen Kavitäten, sowie eine erneute Inkubation der Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt und schüttelnd auf dem Mikrotiter-Platten-Schüttler. Nach erneutem Waschen werden 100 µl Substratlösung zu jeder Probe pipettiert, welche bis zur deutlichen Blaufärbung schüttelnd inkubiert werden. Tritt die Blaufärbung bei allen Kavitäten ein, wird die Absorption der einzelnen Kavitäten im Infinite M200 Pro TECAN Reader bei 370 nm gemessen. Befindet sich diese in einem Absorptionsbereich von 1.2 bis 1.8, werden jeweils 100 µl Stopp-Lösung zugegeben. Anschließend muss die Absorption der Kavitäten bei 450 nm und 590 nm direkt ermittelt werden. Nach Differenzbildung der Absorptions-Units kann der Insulingehalt der Proben im Vergleich zu den Insulinstandards in ng/ml ermittelt werden.

5.3.18 Streptavidin-basierende Affinitätsreinigung (DNA pull-down)

Um Interaktionen von Proteinen und DNA *in vitro* zu untersuchen, kann sich die Eigenschaft von Biotin, stark an Streptavidin zu binden, zu nutze gemacht werden. Dabei werden superparamagnetische µMACS StreptavidinTM MicroBeads verwendet, die zunächst an die Biotin-markierte DNA Sonde binden und danach in einem magnetischen Feld (µMACS-Separator) über eine µ-Säule isoliert werden. An die DNA Sonde gebundene Proteine können anschließend eluiert und analysiert werden.

Zur Durchführung des DNA pull-down Assays (PD) mit dem µMACS StreptavidinTM Kit werden Zellkernextrakte benötigt, die analog Punkt 5.3.2.2 hergestellt werden. Bei Verwendung mehrerer verschieden behandelter Zellkernextrakte werden zunächst alle Proben mit Zellkernlysepuffer C (mit Complete[®] 1:25, 0.5 mM DTT und 450 mM NaCl) auf gleiche Volumina und auf eine Salzkonzentration von 150 mM NaCl verdünnt. Zu jedem Ansatz werden nachfolgend 100 µg/ml Lachssperma-DNA pipettiert und die Ansätze 20 Minuten über Kopf taumelnd bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der Biotin-markierten DNA-Sonde (1 µg Sonde/mg Zellkernextrakt) für 30 Minuten über Kopf taumelnd bei 4°C bevor 50 µl µMACS StreptavidinTM MicroBeads pro µg DNA-Sonde zugegeben werden. Nach einer weiteren taumelnden über Kopf-Inkubation für 12 Minuten bei Raumtemperatur werden die Proben auf eine µ-Säule gegeben. Die µ-Säule wurde zuvor zur magnetischen Isolation und Separation in einem µMACS-Separator auf einem MultiStand befestigt, 2x mit je 50 µl „Äquilibriumspuffer für Proteine“ äquilibriert und 2x mit je 100 µl Zellkernlysepuffer C (mit 150 mM NaCl) gewaschen. Zur Entfernung nicht an die

μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wird die μ -Säule anschließend 15x mit je 100 μ l Zellkernlysepuffer C (mit 150 mM NaCl) gewaschen, bevor eine fünfminütige Inkubation mit 95°C-heißem 1x SDS-Probenpuffer (195 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% Glycerin, 15% β -Mercaptoethanol, 6% SDS, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) folgt. Nach Zugabe weiterer 50 μ l 1x SDS-Probenpuffer können die an die DNA gebundenen Proteine in ein frisches 1.7 ml Reaktionsgefäß eluiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen werden. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran können die Proteine dann immunologisch nachgewiesen werden.

5.3.19 Sucroседichtegradienten-Zentrifugation

Die Dichtegradienten-Zentrifugation wird eingesetzt, um einzelne Proteine einer Zelle aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte und Größe voneinander zu trennen. Durch Gießen eines linearen Sucrose-Gradienten ordnen sich die Proteine nach Ultrazentrifugation innerhalb der Zuckerschicht an, deren Konzentration in etwa der Dichte und Größe des jeweiligen Proteins entspricht. Durch anschließende Fällung der Proteine können diese dann per Western Blot Analyse visualisiert werden.

Zu Beginn wird ein linearer Sucrosegredient aus zwei Sucrose-Lösungen II und III mit 5% und 10% Sucrose in PBS + 1% Tween 20 direkt in die Zentrifugen-Röhrchen gegossen. Am Boden des Röhrchens wird dabei ein Bett mit Sucroselösung I (45% Sucrose in PBS + 1% Tween 20) vorgelegt und nach oben der Gradient gegossen, der linear bis auf 5% abnimmt. Dazu werden beide Lösungen in jeweils eine Kammer eines Gradientenmischers eingefüllt, wobei die höher konzentrierte Lösung in die Reservoirkammer (links) und die mit der niedrigeren Konzentration in die Mischkammer (rechts) gegeben wird. Anschließend wird der Verbindungshahn zwischen beiden Kammern geöffnet und die Lösungen durch einen Magnetrührer in der Reservoirkammer vermischt. Das Zentrifugenröhrchen wird mit der vermischten Lösung bis kurz unter den Rand gefüllt und für 1 Stunde kalt gestellt, sodass die Lösungen etwa eine Temperatur von 4°C annehmen.

Auf die Oberfläche des vorgekühlten Sucrosegredienten wird vorsichtig der zu untersuchende Extrakt (~2 mg) geschichtet und die Zentrifugen-Röhrchen in die Zentrifugenbecher überführt. Nach Austarieren werden die Zentrifugenbecher in den Rotor (SW-41, Beckman) eingehängt, dieser vorsichtig in die Zentrifuge eingesetzt und die Zentrifugation bei 35.000 rpm für 18 Stunden bei 4°C gestartet. Dabei sollen die Proteine entsprechend ihrer Bewegungsgeschwindigkeit im Gradienten aufgetrennt werden und sich so schließlich an

unterschiedlichen Positionen befinden. Das Auslaufen der Zentrifuge muss dabei ohne Bremse stattfinden, da sonst die im Gradient befindlichen Proteine verwirbelt werden können. Nachdem die Zentrifugation abgeschlossen ist, werden die Zentrifugen-Röhrchen aus dem Rotor entnommen und an der Unterseite mit einer 20 G-Kanüle angestochen, sodass Fraktionen à 750 µl in bereitgestellte 1.7 ml Reaktionsgefäße gesammelt werden können. Insgesamt erhält man so zwischen 21 und 24 Fraktionen. Von jeder Fraktion wird in einem Abbé-Refraktometer der jeweilige Brechungsindex und die entsprechende Sucrosekonzentration bestimmt, um die Linearität des Gradienten zu prüfen. Um die Lokalisation einzelner Proteine in den Fraktionen zu analysieren, können die Proteine nachfolgend mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und per Western Blot analysiert werden.

5.3.20 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Konzentrierung von Proteinen mittels Trichloressigsäure, werden zur Probe 10% des Probenvolumens Desoxycholat (DOC; 1 mg/ml) gegeben und diese kurz gevortext. So dann werden die Proteine durch Zugabe von 11% des Probenvolumens 50% (w/v) TCA 10 Minuten auf Eis gefällt. Ähnlich wie SDS bindet Desoxycholat - die deprotonierte, wasserlösliche Form der Desoxycholsäure - an Proteinmoleküle. Durch Zugabe von TCA wird Desoxycholat protoniert und somit wasserunlöslich. Gebundenes Protein copräzipitiert dabei mit der sich bildenden Desoxycholsäure. Um überschüssige Salze zu entfernen, werden nach Zentrifugation (3 Minuten, 16.000xg, RT) jeweils 500 µl eiskaltes Aceton zugegeben, kurz gemischt und die Proben erneut zentrifugiert. Nach Trocknen der Proteinpellets werden diese in 1/10 des ursprünglichen Probenvolumens TCA-Probenpuffer aufgenommen, gekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Falls die Probe noch gelb ist, kann 2.4 M Tris-Base zugegeben werden. Per Western Blot Analyse können die gefällten Proteine immunologisch detektiert werden.

Zur Erstellung der Abschnitte „Materialien“ und „Methoden“ wurde das Methodenbuch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes sowie die Doktorarbeit von Frau Sabrina Klein und die eigene Diplomarbeit zu Hilfe genommen.

6. Ergebnisse

USF1 und 2 (mit Isoform 2b) sind Transkriptionsfaktoren aus der b-HLH Leucin-Zipper Familie, die an sogenannte E-Box Motive in der DNA binden und die Transkription einer Reihe von Genen aus dem Glucose- und dem Lipidstoffwechsel, sowie aus dem Bereich der Blutdruckregulation steuern (Abbildung 4). Darüber hinaus hat USF2 tumorsuppressive Funktionen, USF1 ist eher an stressinduzierten, zellulären Vorgängen beteiligt [43].

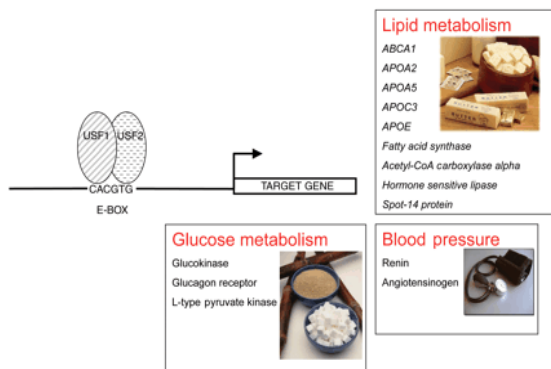


Abbildung 4: Funktionen der USF-Transkriptionsfaktoren. (modifiziert nach [212])

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kietzmann (Oulu, Finnland) wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen USF2 als Interaktionspartner der regulatorischen β -Untereinheit der CK2 gefunden. Die genauere Analyse dieser Interaktion führte in der Arbeitsgruppe Montenarh zur Entdeckung, dass USF1 *in vitro* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird. USF2, das zumeist im Komplex mit USF1 Transaktivierungsereignisse in Gang setzt (Abbildung 4), wird dabei nicht als Substrat von der CK2 akzeptiert. Die Identität der Phosphorylierungsstelle von USF1 konnte in der Arbeitsgruppe Montenarh bereits auf die Aminosäure Threonin an Position 100 innerhalb der Polypeptidkette von USF1 festgelegt werden.

Nachdem erste Untersuchungen über die Wechselwirkung der USF-Proteine und CK2 den Grundstein für die hier vorliegende Dissertation gelegt haben, soll das Augenmerk jetzt auf die Bedeutung dieser Phosphorylierung gelegt werden. Zum einen soll die Assoziation beider Proteine und deren physiologische Bedeutung innerhalb der pankreatischen Zellen bei Glucose-abhängigen Prozessen untersucht werden, und zum anderen deren Interaktion mit PDX-1, dem Schlüsselfaktor für Wachstum und Erhalt der β -Zellen [12], analysiert werden.

6.1 Charakterisierung der Interaktion der USF-Proteine und CK2 in INS-1-Zellen und im Pankreasgewebe

Zur Analyse der Interaktion der USF-Proteine und CK2 im Zellkulturmodell wurden INS-1-Zellen (INSulinoma1-Zellen) verwendet. Dabei handelt es sich um endokrine Zellen der Langerhans-Inseln eines Ratten-Pankreas, welches aufgrund einer Behandlung mit Röntgenstrahlung (10 J/kg Körpergewicht, 566 Tage) einen seltenen, gutartigen, transplantablen Tumor, das Insulinom entwickelte, das große Mengen an Insulin produziert [40]. Durch Kultivierung einzelner Insulinoma-Zellen in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol konnten daraus stabile Insulin-sekretierende Zelllinien (INS-1, INS-2) etabliert werden, deren Morphologie, Insulinbiosynthese und -sekretion ähnlich zum propagierten Tumor *in vivo* ist [16]. Stimuliert man solche Zellen nun mit Glucose, reagieren sie darauf zum einen mit der Sekretion des in den Vesikeln gespeicherten Insulins, und zum anderen mit einer gesteigerten Insulinbiosynthese [40]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten stabilen Glucose-responsiven INS-1-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie in kleinen Zellverbänden, ähnlich den physiologischen, pankreatischen Inseln, wachsen, wie in Abbildung 5 deutlich zu erkennen ist. Zum Wachstum werden sie bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium mit 11 mM Glucose, welches mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 50 μ M β -Mercaptoethanol angereichert ist, kultiviert.

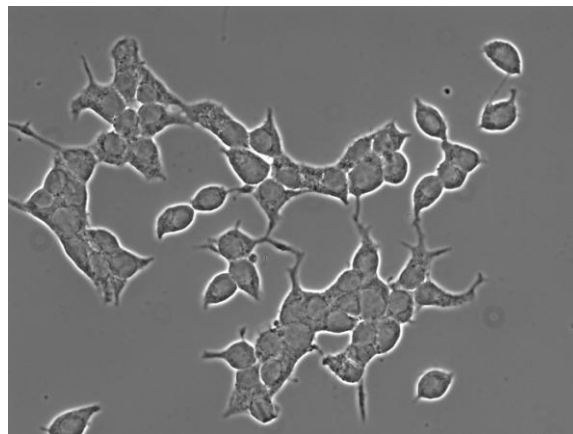


Abbildung 5: Durchlichtaufnahme von Glucose-responsiven INS-1-Zellen, die sich im Zellverband ähnlich kleiner pankreatischer Inseln angeordnet haben. Die Bilder wurden mit einem Axioskop Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40x Öl).

Zur Überprüfung der Funktionalität der verwendeten INS-1-Zellen bezüglich Glucose-abhängiger, zellulärer Prozesse, sollte deren Fähigkeit, auf einen Glucosestimulus hin mit der

Freisetzung von Insulin zu reagieren, analysiert werden. Zur Analyse eines Einflusses von Glucose auf die Menge an freigesetztem Insulin, wurden die Zellen über Nacht in Medium kultiviert, das außer Glucose alle anderen wichtigen Nahrungsbestandteile für das Zellwachstum enthält. Nach einem solchen Glucoseentzug sollten die Glucosereserven der Zellen soweit ausgeschöpft sein, dass sie auf einen Glucosestimulus hin mit der Freisetzung von Insulin aus ihren sekretorischen Vesikeln reagieren. Das freigesetzte Insulin kann im Kulturüberstand mithilfe eines spezifischen „Enzyme linked Immunosorbent Assays“ (ELISA-Test) nachgewiesen werden. Dazu wurden INS-1-Zellen über Nacht unter Glucosekarenz gehalten, bevor sie über einen Zeitraum von 4 Stunden einer Behandlung mit 0 mM Glucose (Glucosekarenz), 5 mM Glucose (Normoglucose), 11 mM Glucose (physiologische Glucosekonzentration im Zellkulturmedium) oder 25 mM Glucose (Hochglucose) ausgesetzt wurden. Der Mediumüberstand der behandelten Zellen wurde nach 4 Stunden entnommen und die darin enthaltene Insulinmenge mithilfe eines ELISA-Kits der Firma Millipore bestimmt. In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass die Insulinkonzentration im Kulturmedium nach Glucosestimulation proportional zur Glucosekonzentration ansteigt. Dieses Ergebnis lässt auf die Funktionalität der INS-1-Zellen schließen, auf einen Glucosereiz hin Insulin ins Medium auszuschütten.

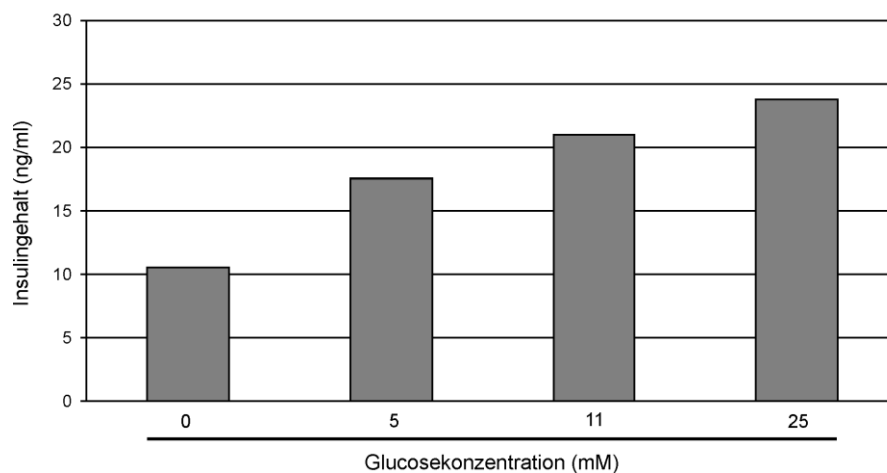


Abbildung 6: Insulinkonzentration in ng/ml ermittelt durch ELISA-Technik im Kulturmedium von INS-1-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose. INS-1-Zellen wurden zum Glucoseentzug über Nacht in Medium ohne Glucose kultiviert, bevor ein Glucosestimulus von 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose zugeführt wurde. Nach 4 Stunden wurden den Zellen Mediumproben entnommen, aus denen mittels eines ELISA-Kits die Insulinkonzentration in ng/ml ermittelt wurde.

Zur Analyse des Zusammenwirkens der USF-Proteine, PDX-1 und der CK2 in den INS-1-Zellen ist es essentiell, zunächst das Vorhandensein, sowie die subzelluläre Lokalisation der zu untersuchenden Proteine im verwendeten Zellsystem zu ermitteln.

Zunächst wurde ein biochemischer Nachweis der USF-Proteine und der CK2, und zur weiteren Verifizierung der Funktionalität der pankreatischen β -Zellen auch von PDX-1, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein INS-1-Gesamtzelllysat (Gesamt), sowie ein Zellkern- (KE) und ein Cytoplasmaextrakt (Cyto) von INS-1-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und die genannten Proteine immunologisch mit spezifischen Antikörpern per Western Blot nachgewiesen. In Abbildung 7 a-c ist das Ergebnis eines Versuches exemplarisch dargestellt. Der überwiegende Nachweis von TFIID als Zellkernmarker im Zellkernextrakt und der Nachweis von α -Tubulin als cytoplasmatisches Protein im Cytoplasmaextrakt im Abbildungsteil a zeigen, dass die Zellfraktionierung der INS-1-Zellen im Rahmen dieser Analyse zu einer guten Trennung der beiden Fraktionen führte. Sowohl USF1, USF2, PDX-1, als auch alle CK2-Untereinheiten konnten in verschiedenen Fraktionen der Glucose-sensitiven INS-1-Zellen nachgewiesen werden, was sich in den Abbildungsteilen b und c erkennen lässt. Hierbei zeigt sich, dass die Transkriptionsfaktoren USF1, USF2 und PDX-1 fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Dort sind sie, im Vergleich zum Gesamtzelllysat, zudem auch viel stärker nachzuweisen. Die CK2-Untereinheiten sind vorrangig cytoplasmatisch lokalisiert und nur zu einem geringeren Anteil im Zellkern nachzuweisen. Abbildungsteil 7 d zeigt die densitometrische Auswertung mehrerer Zellfraktionierungen und die prozentuale Verteilung der für diese Arbeit wichtigsten Proteine USF1, USF2 und CK2 in INS-1-Zellen mit der BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software. Dabei wurden für die Quantifizierung die Mengen an TFIID im Cytoplasmaextrakt und α -Tubulin im Zellkernextrakt zur Bestimmung der mengenmäßigen Verteilung von USF1, USF2 und CK2 in den Zellkern- und Cytoplasmafraktionen mit eingerechnet.

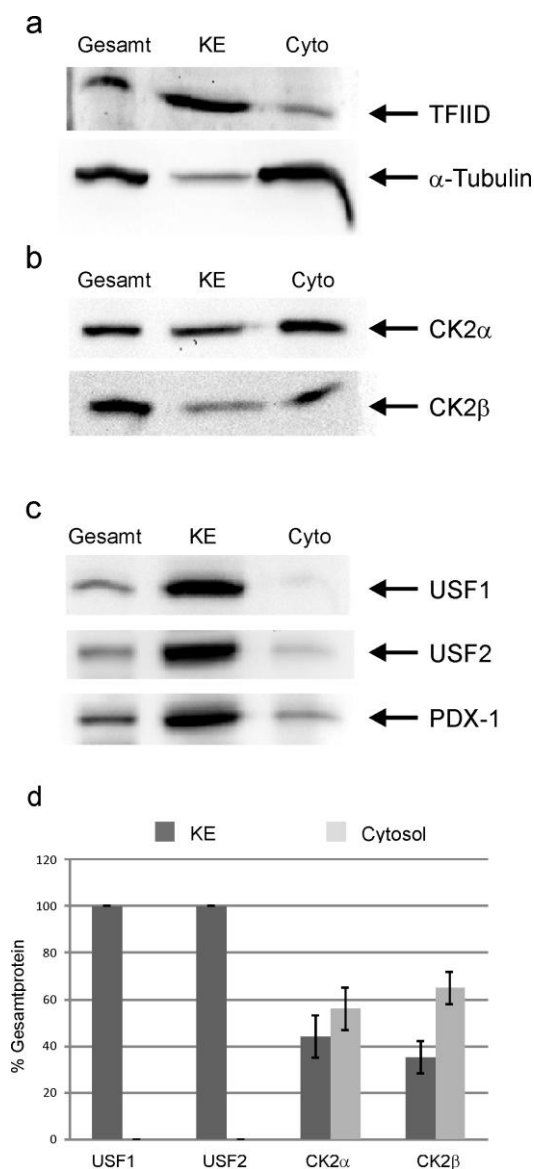


Abbildung 7: Biochemischer Nachweis der USF-Proteine, von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in Zellextrakten von INS-1-Zellen. Fünfzig μ g eines INS-1-Gesamtzelllysates (Gesamt), sowie eines Zellkern- (KE) und eines Cytoplasmaextraktes (Cyto) wurden in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse (a) als Kontrolle für eine gute Zellfraktionierung mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α -Tubulin als Cytoplasmamarker, und mit dem TFIID-Antikörper (sc-273) als Zellkernmarker versehen. (b) Der monoklonale Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α und der monoklonale Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) gegen CK2 β wurden zum Nachweis der CK2-Untereinheiten verwendet. (c) Der Nachweis von USF1 und USF2 wurde mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern (sc-8683 für USF1 und sc-862 für USF2) durchgeführt, PDX-1 wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper oder Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht. (d) Densitometrische Auswertung der Proteinmengen von USF1, USF2, CK2 α und CK2 β in Zellkern- und Cytoplasmafraktionen von INS-1-Zellen mit der Software BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten. Zur Quantifizierung wurden die Mengen an TFIID im Cytoplasmaextrakt und α -Tubulin im Zellkernextrakt zur

6. Ergebnisse

Bestimmung der mengenmäßigen Verteilung von USF1, USF2 und CK2 in den Zellkern- und Cytoplasmafraktionen mit eingerechnet.

Um das Vorkommen der einzelnen Proteine in den verschiedenen Kompartimenten der INS-1-Zellen auch im Pankreasgewebe, und somit die Übertragbarkeit der bisher erhaltenen Daten auf das Tiermodell zu überprüfen, wurden Zellkern- (KE) und Cytoplasmaextrakte (Cyto) aus murinem Pankreas hergestellt. Der biochemische Nachweis von PDX-1, den USF-Proteinen und den beiden CK2-Untereinheiten wurde analog zum Nachweis in INS-1-Zellen mit den spezifischen Antikörpern durchgeführt. Wie sich in Abbildung 8 a erkennen lässt, ließen sich Zellkern und Cytoplasma des Gesamtpankreasgewebes gut trennen und es gibt nur wenige Verunreinigungen in beiden Fraktionen. Was die Lokalisation der beiden CK2-Untereinheiten α und β betrifft, zeigt sich in Abbildung 8 b, ähnlich zu den INS-1-Zellen, eine Verteilung beider Proteine im Zellkern- und Cytoplasmaextrakt. Die Transkriptionsfaktoren PDX-1, USF1 und USF2 sind auch im murinen Pankreas fast ausnahmslos im Zellkern nachzuweisen (Abb. 8 c), was demnach die Ergebnisse in INS-1-Zellen bestätigt.

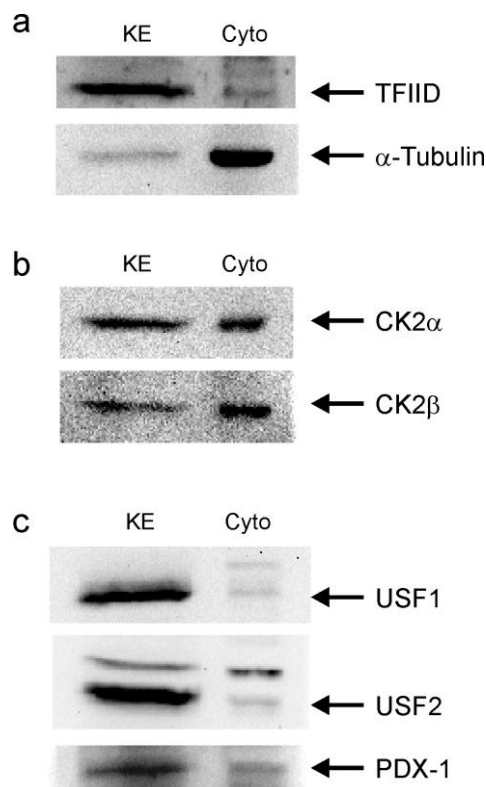


Abbildung 8: Biochemischer Nachweis der USF-Proteine, von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in Zellkern- und Cytoplasmaextrakten von murinem Pankreasgewebe. Fünfzig μ g eines murinen Pankreaszellkern- (KE) und -cytoplasmaextraktes (Cyto) wurden in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse (a) als Kontrolle für eine gute Zellfraktionierung mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α -Tubulin als Cytoplasmamarker und mit dem TFIID-Antikörper (sc-273) als

Zellkernmarker versehen. (b) Der monoklonale Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α und der monoklonale Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) gegen CK2 β wurden zum Nachweis der CK2-Untereinheiten verwendet. (c) Der Nachweis von USF1 und USF2 wurde mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern (sc-8683 für USF1 und sc-862 für USF2) durchgeführt, PDX-1 wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht.

Nachdem durch Fraktionierung von INS-1-Zellen und murinem Pankreasgewebe erste Hinweise über das Vorhandensein und die subzelluläre Lokalisation der USF-Proteine und der Untereinheiten der CK2 geklärt waren, wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine mit einer weiteren, sensitiveren Methode untersucht. Da eine mögliche Interaktion beider Proteine davon abhängt, ob die Proteine zur gleichen Zeit am gleichen Ort lokalisiert sind, wurde ihre räumliche Verteilung innerhalb der INS-1-Zellen durch Immunfluoreszenzanalyse überprüft. Dazu wurden die INS-1-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 Stunden fixiert, sodass eine immunologische Färbung von USF1, USF2 und den CK2-Untereinheiten mit spezifischen Antikörpern möglich war. USF1 wurde entweder mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229, oder dem monoklonalen Maus-Antikörper sc-390027 detektiert, USF2 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862. CK2 α wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5, CK2 β entweder mit dem CK2 β -spezifischen Kaninchen-Serum #269, oder dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) nachgewiesen. Als Kontrolle für eine cytoplasmatische Färbung wurde zusätzlich α -Tubulin mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gefärbt. Nach Einsatz fluoreszenzgekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594- oder Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488- Antikörper und anschließender Zellkernfärbung mit DAPI, war mittels Immunfluoreszenz-Technik ein Rückschluss auf das subzelluläre Vorkommen der untersuchten Proteine möglich. Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, dass sich die α -Untereinheit der CK2 sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma der INS-1-Zellen befindet, wohingegen die β -Untereinheit der CK2 größtenteils nur cytoplasmatisch lokalisiert ist. Die USF-Proteine sind hauptsächlich im Zellkern der INS-1-Zellen colokalisiert, was in einer deutlich gelben Färbung durch die Überlagerung der Rotfluoreszenz von USF2 mit der grünen Färbung von USF1 resultiert. Kombinationen von Färbungen der USF-Proteine mit den einzelnen CK2-Untereinheiten zeigen, dass die USF-Proteine und nur ein Teil der CK2-Fraktionen im gleichen Kompartiment der INS-1-Zellen vorkommen. Eine Interaktion beider USF-Proteine

mit den CK2-Untereinheiten wäre aus den bisher erhaltenen Ergebnissen demnach im Zellkern der INS-1-Zellen am wahrscheinlichsten.

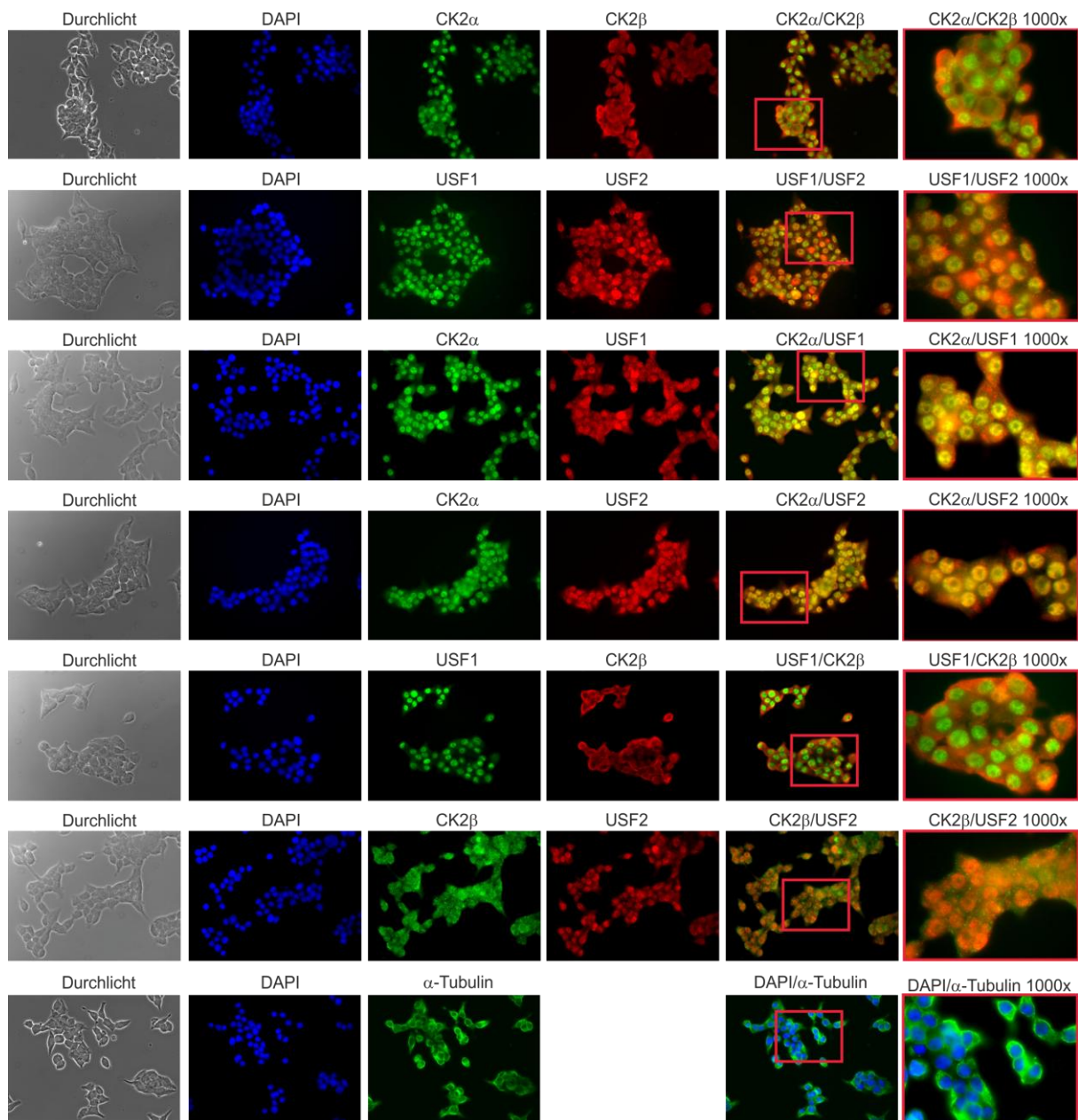


Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation von USF1 und USF2 und den Untereinheiten der CK2 in INS-1-Zellen. Fixierte INS-1-Zellen auf Deckgläschen wurden mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 oder dem monoklonalen Maus-Antikörper sc-390027 gegen USF1, und mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 gegen USF2 gefärbt. CK2 α konnte mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5, CK2 β entweder mit dem CK2 β -spezifischen Kaninchen-Serum #269, oder dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) nachgewiesen werden. Als Kontrolle für eine cytoplasmatische Färbung wurde zusätzlich α -Tubulin mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594- und ein Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488-Antikörper verwendet, sowie eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Zum Nachweis von Proteincolokalisationen wurden die Rot- und Grün- bzw. die Blau- und Grünfärbungen übereinandergelegt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem

Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40x Öl und 100x Öl).

Nachdem die subzelluläre Lokalisation der USF-Proteine und CK2 durch zwei unabhängige Methoden festgestellt war, galt es als nächstes festzustellen, ob es auch eine Interaktion und Bindung zwischen den Proteinen in den INS-1-Zellen gibt. Zur Analyse einer möglichen Komplexbildung beider USF-Proteine mit beiden CK2-Untereinheiten wurde ein Duolink[®] *In Situ* „Proximity Ligation Assay“ (PLA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in einzelnen Zellen. Diese Interaktionen werden durch die Entstehung von Spots angezeigt, wobei ein Spot nur dann entsteht, wenn sich beide Proteine in räumlicher Nähe innerhalb der Zelle befinden. Hervorgerufen werden die Spots durch die Verwendung von Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern (PLA Proben), welche jeweils mit komplementären, Fluoreszenzfarbstoff-gebundenen Oligonukleotidsträngen gekoppelt sind (Anti-Kaninchen PLUS und Anti-Maus MINUS). Befinden sich die beiden PLA Proben nach Bindung an die jeweiligen Primärantikörper in räumlicher Nähe, kommt es zur enzymatischen Verknüpfung und Amplifikation der beiden Oligonukleotidstränge, deren Fluoreszenz mittels Mikroskopie als einzelne Spots sichtbar gemacht werden kann. Für die Analyse einer möglichen Interaktion wurden auf Deckgläschen fixierte INS-1-Zellen einer Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen USF1 (monoklonaler Maus Antikörper sc-390027 oder polyklonaler Kaninchen Antikörper sc-229), USF2 (polyklonaler Kaninchen Antikörper sc-862), CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und CK2 β (Kaninchen-Antiserum #269 oder monoklonaler Maus-Antikörper E-9 sc-46666), sowie zur Angabe der Spezifität mit den Einzelantikörpern gegen USF1, USF2, CK2 α und CK2 β , als auch nur mit den PLA Proben unterzogen. In Abbildung 10 a ist zu erkennen, dass die Doppelfärbungen der USF-Proteine mit beiden CK2-Untereinheiten eine Vielzahl von Spots innerhalb der Zellkerne zeigen, welche für eine eindeutige Assoziation beider Proteine in den INS-1-Zellen stehen. Im Vergleich dazu waren bei den Färbungen der einzelnen Antikörper und den PLA Proben nur wenige Spots sichtbar, was für eine erfolgreiche experimentelle Durchführung des PLA Assays spricht (Daten nicht gezeigt). Zur besseren Übersicht der mengenmäßigen Verteilung der Spots in den einzelnen Versuchsansätzen wurden die Spots von vier Aufnahmen verschiedener Bereiche komplett ausgezählt und ihre Anzahl pro Zelle vermerkt. Anschließend wurde die Spotanzahl in je 50 Zellen errechnet und für die Doppelfärbungen graphisch in Abbildung 10 b abgebildet. Die Auszählung der Spots des Doppelfärbungsexperiments suggeriert allerdings eine stärkere

Interaktion der USF-Proteine mit CK2 α als mit CK2 β , was aber aus den unterschiedlichen Affinitäten der verwendeten Antikörper zu ihren Antigenen resultieren kann. Dieses Experiment ist ein erster Hinweis dafür, dass es eine direkte Assoziation der USF-Proteine und der CK2-Untereinheiten in INS-1-Zellen gibt.

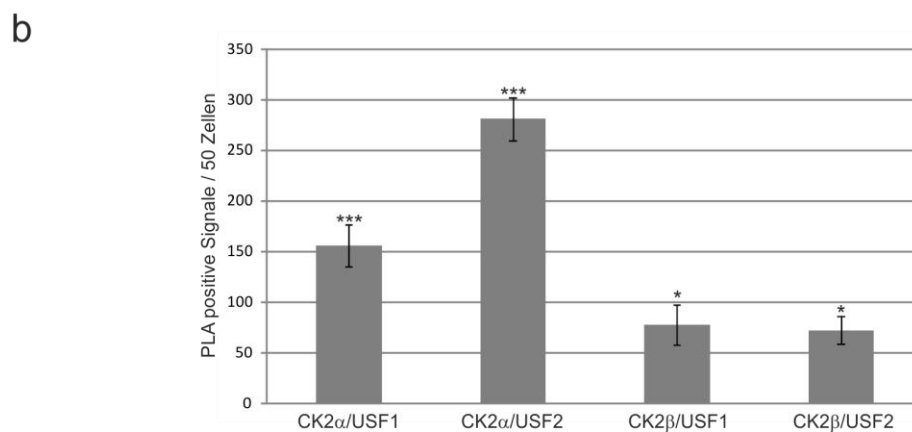
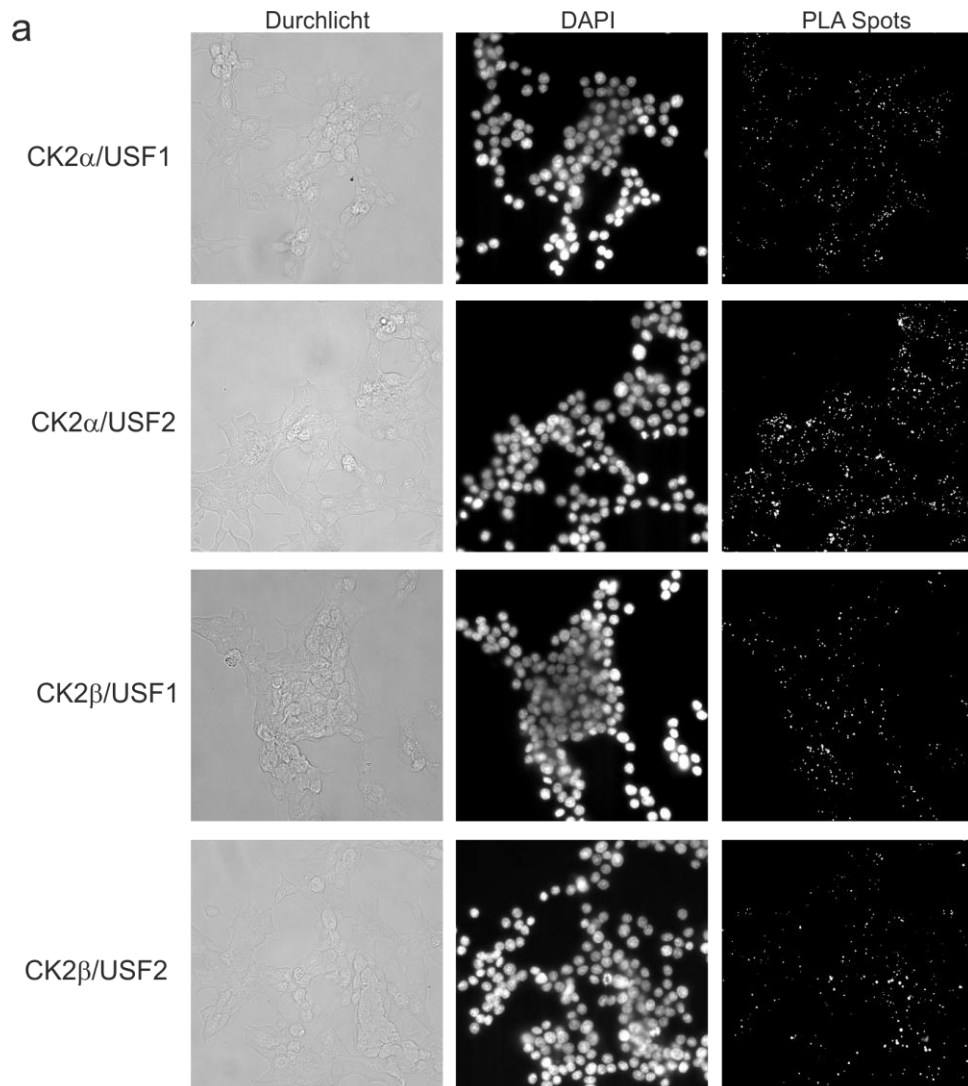


Abbildung 10: Duolink® *In Situ* „Proximity Ligation Assay“ (PLA) der USF-Proteine und CK2 α bzw. CK2 β in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden auf Deckgläschen kultiviert und nach dem Fixieren Doppelfärbungen von USF1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-229 oder monoklonaler Maus-Antikörper sc-390027) bzw. USF2 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-862) mit CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) bzw. CK2 β (Kaninchen-Antiserum #269 oder monoklonaler Maus-Antikörper E-9 sc-46666) unterzogen. DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Bilder wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40x Öl). (b) Spots von Aufnahmen verschiedener Bereiche wurden komplett ausgezählt und ihre Anzahl pro Zelle notiert. Anschließend wurde die Spotanzahl in je 50 Zellen errechnet und graphisch dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Aufnahmen innerhalb aller Versuchsansätze. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bestimmt, wobei * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ ist.

Nach den erhaltenen Daten der Fraktionierung und der Fluoreszenzanalysen in INS-1-Zellen zeigt sich übereinstimmend, dass die USF-Proteine als klassische Transkriptionsfaktoren überwiegend im Zellkern vorzufinden sind, wohingegen die CK2-Untereinheiten sowohl nukleär, als auch cytoplasmatisch innerhalb der β -Zellen verteilt sind. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion der USFs untereinander und der USF-Proteine mit CK2 sollte daher am besten im Zellkern der Zellen nachzuweisen sein, weshalb die direkte Bindung beider Proteine nachfolgend mit Zellkernextrakten aus INS-1-Zellen analysiert wurde.

Zunächst wurde als Kontrolle für eine Bindungsanalyse der USF-Proteine und CK2 die in der Literatur beschriebene Bindung von USF1 und USF2 [268, 269] per Coimmunpräzipitation in den hier verwendeten INS-1-Zellen überprüft. Dazu wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt und 2 mg Zellkernextrakt mit einer Kombination aus Protein-G- und CL-4B-Sephrose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-229 oder sc-8683) bzw. gegen USF2 (sc-862), für 2 Stunden bei 4°C inkubiert, sodass im Zellkernextrakt vorhandene Komplexe von USF1 und USF2 an die entsprechenden Antikörper binden können. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit den entsprechenden Kontrollen (50 μ g Zellkernextrakt (KE), Präzipitationskontrolle (VP), Antikörperkontrolle (AK) und Sepharosekontrolle (S)), sowie nachfolgender Western Blot Analyse war es möglich, mit USF1 copräzipitiertes USF2, und mit USF2 copräzipitiertes USF1 nachzuweisen. Dies ist in Abbildung 11 a und b dargestellt und bedeutet, dass Komplexe aus USF1 und USF2 auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen gebildet werden. Um nun mögliche Komplexe aus USF und CK2 nachzuweisen, wurde eine Coimmunpräzipitation von USF2 mit CK2 α und CK2 β analog der USF-Coimmunpräzipitation durchgeführt. Per

Western Blot Analyse war es ebenfalls möglich, mit USF2 copräzipitierte CK2-Proteine mit Antikörpern gegen CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und CK2 β (monoklonaler Maus-Antikörper 6D5) nachzuweisen (Abbildung 11 c). In der Zellkernextraktkontrolle, die im Verhältnis zur IP nur 2.5% der eingesetzten Zellkernextraktmenge darstellt, sind die CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten deutlich nachweisbar. In der Immunpräzipitationsspur ist im Vergleich dazu, wenn auch nur schwach, eine Bande sowohl für CK2 α , als auch für CK2 β vorhanden. Die Kontrollspuren, in denen nur Sepharose (S) bzw. Sepharose mit dem präzipitierten Antikörper (AK) geladen wurde, zeigen keine Banden, was für eine erfolgreiche und spezifische Immunpräzipitation der nachgewiesenen Proteine spricht. Somit kann festgehalten werden, dass in INS-1-Zellen beide USF-Proteine im Zellkern an CK2 α und CK2 β binden.

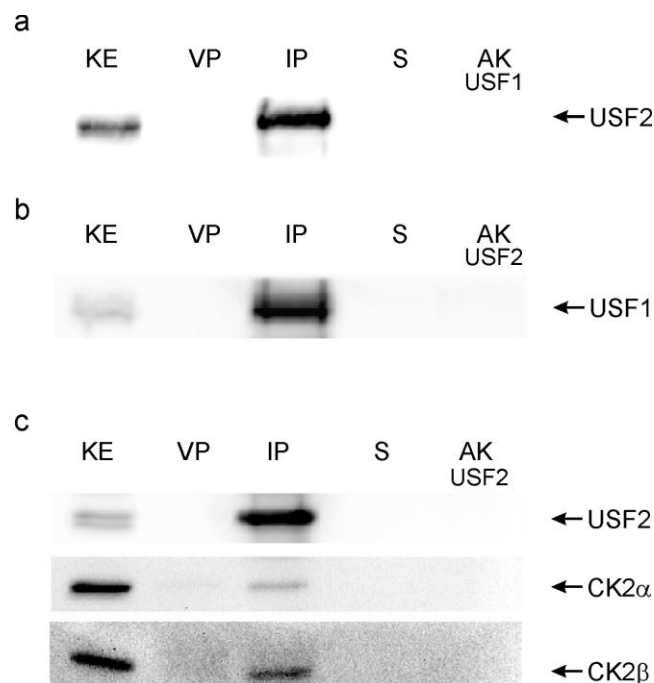


Abbildung 11: Coimmunpräzipitation von USF1/USF2 und von USF und CK2 aus Zellkernextrakten von INS-1-Zellen. Zwei mg Gesamtproteine im Zellkernextrakt von INS-1-Zellen wurden zusammen mit einem Gemisch aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-229) oder gegen USF2 (sc-862), 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (VP) sowie einer Zellkernextraktkontrolle (KE, 50 μ g), einer Antikörperkontrolle (AK) und einer Sepharosekontrolle (S) in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. (a) Die Sichtbarmachung von mit USF1 copräzipitiertem USF2 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. (b) Die Sichtbarmachung von mit USF2 copräzipitiertem USF1 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. (c) Die Sichtbarmachung von copräzipitierter CK2 erfolgte für die

CK2 α -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und für die CK2 β -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. VP: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, KE: Zellkernextrakt (2.5% der zur IP eingesetzten Zellkernextraktmenge), AK: Antikörperkontrolle, S: Sepharosekontrolle.

Zusammenfassend kann aus diesen ersten Studien geschlossen werden, dass die USF-Proteine und beide CK2-Untereinheiten α und β in INS-1-Zellen exprimiert werden, und dass die USFs überwiegend im Zellkern der pankreatischen Zellen lokalisiert sind, wohingegen die CK2-Untereinheiten sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma der Zellen nachzuweisen sind. Dies entspricht auch dem Zustand im murinen Pankreas und bestätigt somit die Versuche in den pankreatischen Rattenzellen. Die Ergebnisse der Zellfraktionierung von INS-1-Zellen konnte zudem durch Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden und legen eine Interaktion der USFs mit CK2 im Zellkern der Zellen nahe. Eine solche Interaktion konnte im PLA-Assay identifiziert, und eine Bindung beider Proteine im Zellkernextrakt von INS-1-Zellen durch Coimmunpräzipitation bestätigt werden. Dementsprechend liegt nur eine kleinere Subfraktion der CK2 colokalisiert mit USF1 und USF2 im Zellkern der β -Zellen vor, wobei diese Subfraktion von CK2 α und CK2 β an beide USFs bindet.

6.2 Analyse einer USF1-Phosphorylierung durch die CK2 in INS-1-Zellen

Nachdem die Bindung der USF-Proteine sowohl an CK2 α , als auch an CK2 β gezeigt worden war, wurde die in der Arbeitsgruppe Montenarh mit bakteriell exprimierten und aufgereinigten Proteinen bestätigte Substrat-Enzym-Interaktion von USF1 mit CK2 auch in INS-1-Zellen überprüft.

Zur Analyse einer CK2-Phosphorylierung von USF1 können unterschiedliche Methoden angewandt werden. Zum einen kann mit einer USF1-Phosphorylierungsmutante gearbeitet werden, wobei die von der CK2 phosphorylierte Aminosäure Threonin an Position 100 mittels ortsgerichteter Mutagenese durch ein nicht-phosphorylierbares Alanin ersetzt wurde (USF1_{T100A}). Zum anderen können CK2-spezifische Inhibitoren, welche in Form von ATP-kompetitiver Inhibition die Kinasefunktion der CK2 in der Zelle einschränken, genutzt werden. Dazu zählen Quinalizarin [45] und TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol) [117]. In den letzten Jahren wurden beide Hemmstoffe jedoch mehr und mehr von CX-4945 (Silmitasertib) [169, 216, 266] abgelöst, welches bereits in klinischen Studien eingesetzt wird [24, 216]. Da keiner dieser Hemmstoffe monoselektiv nur die CK2-Aktivität inhibiert, wurden bei zellulären Analysen immer mehrere Hemmstoffe parallel verwendet. Um zu

testen, inwieweit die beschriebenen CK2-Inhibitoren in den verwendeten INS-1-Zellen die Aktivität der CK2 beeinflussen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit den jeweiligen Hemmstoffen behandelt. In Anlehnung an CK2-Hemmexperimente in anderen pankreatischen Zellsystemen der Arbeitsgruppe Montenarh, wurden die eingesetzten Konzentrationen an CK2-Inhibitor in INS-1-Zellen wie folgt gewählt: Quinalizarin: 50 μ M, TBB: 50 μ M, CX-4945: 10 μ M. Nach Zellernte und Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden jeweils 30 μ g der Proben dem bereits auf Seite 48 beschriebenen *in vitro*-CK2-Kinaseassay, welcher spezifisch für die CK2 ist, ausgesetzt. In Abbildung 12 ist das Resultat der CK2-Hemmung mit den beschriebenen Inhibitoren im Vergleich zu DMSO als Lösungsmittelkontrolle gezeigt. Aus dem Experiment kann geschlussfolgert werden, dass alle Inhibitoren in der eingesetzten Menge eine Aktivitätsminderung der CK2 auf mindestens 50-60% Restaktivität zeigen, wobei CX-4945 den stärksten Hemmeffekt aufweist. CX-4945 hat zudem den Vorteil, dass es im Vergleich zu Quinalizarin und TBB in geringerer Menge eingesetzt werden kann, um zum einen einen vergleichbaren Hemmeffekt zu erzielen, und um zum anderen weitere „off-target“-Effekte zu minimieren. Höhere Konzentrationen an Inhibitor zur weiteren Senkung der CK2-Aktivität in INS-1-Zellen konnten nicht eingesetzt werden, da dies zur Auslösung von Apoptose und somit zum Zelltod der INS-1-Zellen führte.

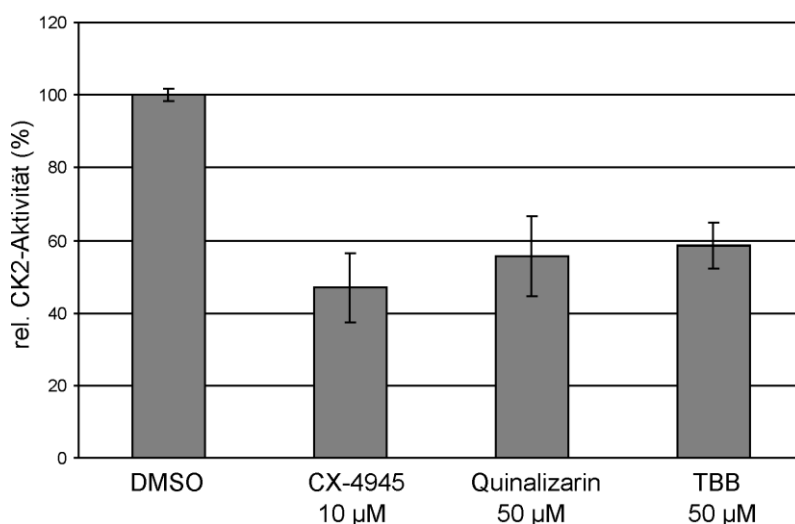


Abbildung 12: *In vitro*-CK2-Kinaseassay aus Gesamtzellextrakten von INS-1-Zellen nach vorheriger Behandlung der Zellen mit verschiedenen CK2-Inhibitoren bzw. DMSO. INS-1-Zellen wurden mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M Quinalizarin oder 50 μ M TBB bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach Herstellung von Zelllysaten wurde die Aktivität der im Zellextrakt enthaltenen CK2 mithilfe eines spezifischen Substratpeptids bestimmt, die Aktivitäten der DMSO-Kontrolle wurden 100% gesetzt und die Aktivitäten in den Hemmstoff-behandelten Ansätzen relativ dazu berechnet. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten im Vergleich zu DMSO dar.

Die Effekte des Inhibitors CX-4945 bezüglich der Hemmung der Kinaseaktivität der CK2 wurden in weiteren Analysen noch genauer auf die eingesetzten Konzentrationen und die Dauer der Behandlung untersucht. Hierfür wurden INS-1-Zellen zunächst entweder für 24 Stunden mit CX-4945 in verschiedenen Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M und 10 μ M) bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder mit 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h behandelt. Nach Zellernte und Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde ein *in vitro*-CK2-Kinaseassay analog Seite 48 durchgeführt. Wie sich in Abbildung 13 a erkennen lässt, tritt die stärkste Hemmung der CK2-Kinaseaktivität nach 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945 ein (ca. 30% Restaktivität), wobei auch mit 5 μ M CX-4945 eine vergleichbare Hemmung der CK2 erzielt werden kann (ca. 40% Restaktivität). Mit 1 μ M CX-4945 lässt sich die CK2-Aktivität kaum mindern (ca. 80% Restaktivität). Betrachtet man die Dauer der Behandlung mit 10 μ M CX-4945 in Abbildung 13 b zeigt sich, dass bereits nach halbstündiger Hemmstoff-Behandlung eine vergleichbare CK2-Aktivitätsminderung wie nach 24 Stunden erreichbar ist. Durch die Verwendung junger Passagen der INS-1-Zellen und einer frischen Hemmstofflösung konnte die CK2-Aktivität zudem noch etwas stärker inhibiert werden als dies in Abbildung 12 der Fall war. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in weiteren Experimenten stets eine Konzentration von 10 μ M frischer CX-4945-Lösung verwendet.

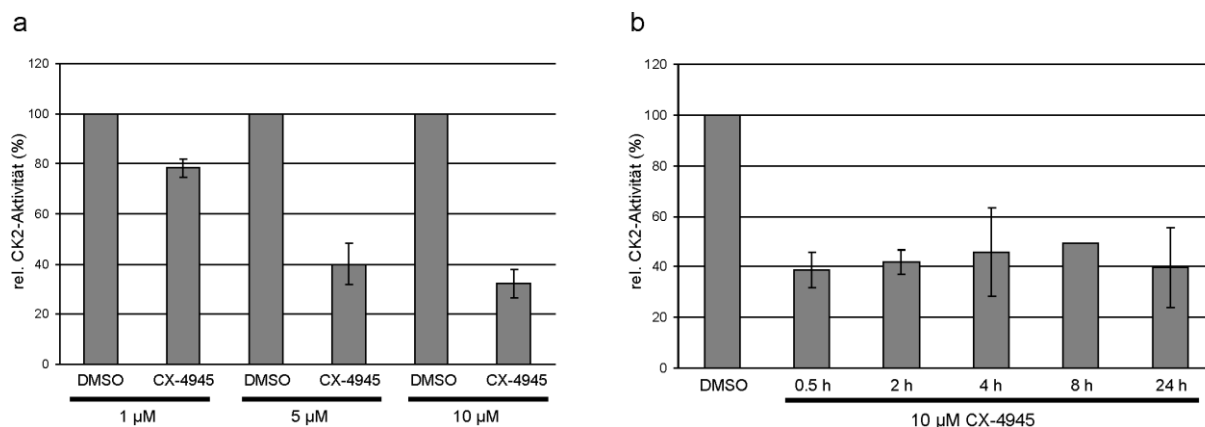


Abbildung 13: *In vitro*-CK2-Kinaseassay aus INS-1-Gesamtzellextrakten nach vorheriger Behandlung der Zellen mit CX-4945 in verschiedenen Konzentrationen, oder nach vorheriger Behandlung der Zellen mit 10 μ M CX-4945 für verschiedene Zeiten. INS-1-Zellen wurden entweder (a) mit 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden, oder (b) mit 10 μ M CX-4945 für 0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Herstellung von Zelllysaten wurde die Aktivität der im Zellextrakt enthaltenen CK2 mithilfe eines spezifischen Substratpeptids bestimmt, die Aktivitäten der DMSO-Kontrolle wurden 100% gesetzt und die Aktivitäten in den Hemmstoff-behandelten Ansätzen relativ dazu berechnet. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten im Vergleich zu DMSO dar.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass mit verschiedenen Hemmstoffen und vor allem mit CX-4945 eine gute Hemmung der CK2-Aktivität zu erzielen ist, wurde überprüft, ob die in INS-1-Zellen bestätigte Bindung der USF-Proteine mit CK2 auch eine funktionelle Enzym-Substrat-Interaktion darstellt und an USF gebundene CK2 auch in INS-1-Zellen aktiv ist und USF1 phosphorylieren kann.

Dazu wurde zunächst ein spezifischer *in vitro*-CK2-Kinaseassay am Immunpräzipitat von USF2 durchgeführt. INS-1-Zellen wurden ausgesät, und nach Zellernte und -lyse 8 mg Gesamtzellextrakt eingesetzt um USF2 analog Punkt 5.3.9 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 2 Stunden bei 4°C rollend zu präzipitieren. Nach Waschen aller Ansätze wurde die Sepharose des Vorpräzipitates (VP) und Immunpräzipitates (IP) auf jeweils 4 Ansätze aufgeteilt. Zu je 2x Vorpräzipitat (VP) und je 2x Immunpräzipitat (IP) wurden 10 µM CX-4945, synthetisches Substratpeptid mit der spezifischen CK2-Sequenz RRRDDDSDDD in CK2-Reaktionsmix und zum Starten der Phosphorylierungsreaktion 10 µCi/500 µl [³²P]-γ-ATP gegeben. Die anderen beiden Vorpräzipitate (VP) und Immunpräzipitate (IP) wurden analog mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle anstatt mit CX-4945 behandelt, allerdings zusätzlich noch ohne Zugabe von synthetischem Substratpeptid. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert, bevor sie auf Whatman P81 Ionenaustausch-Filterpapier übertragen wurden und der *in vitro*-CK2-Kinaseassay analog Punkt 5.3.10 durchgeführt wurde. Zur Auswertung wurde der Einbau an radioaktiv-markiertem Phosphat der Ansätze ohne synthetisches Substratpeptid von den entsprechenden Ansätzen mit synthetischem Substratpeptid subtrahiert. Anschließend wurde die Hintergrundstrahlung (im Ansatz ohne Zelllysate) von jeder Probe abgezogen, die Werte des Vorpräzipitates (VP) vom jeweiligen Immunpräzipitat (IP) subtrahiert und die erhaltenen IP-Werte prozentual dargestellt. In Abbildung 14 ist das Ergebnis des Experimentes dargestellt. Es zeigt sich, dass die relative CK2-Aktivität am Immunpräzipitat von USF2 nach Zugabe von CX-4945 stark abnimmt und auf ca. 11% Restaktivität sinkt. Dies deutet darauf hin, dass am Immunpräzipitat von USF2 aktive CK2 copräzipitiert wurde, welche nach Zugabe des Inhibitors gehemmt wurde und folglich nicht mehr in der Lage war, das synthetische Substratpeptid im Ansatz zu phosphorylieren. Da aus vorherigen Analysen geschlossen werden kann, dass USF1 stets mit USF2 copräzipitiert vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass die CK2 demnach in den verwendeten INS-1-Zellen auch USF1 am USF2-IP phosphorylieren kann.

6. Ergebnisse

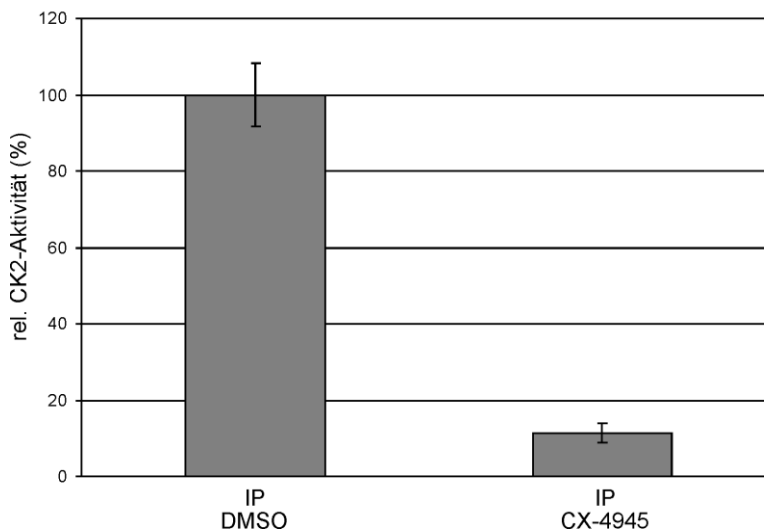


Abbildung 14: *In vitro*-CK2-Kinasesassay am Immunpräzipitat von USF2 aus INS-1-Gesamtzellextrakten.

Acht mg Zellextrakt aus INS-1-Zellen wurde zusammen mit einem Gemisch aus Protein-G- und CL-4B-Sephrose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose des Vorpräzipitates (VP) und des Immunpräzipitates (IP) auf jeweils 4 Ansätze verteilt. Zu je 2x Vorpräzipitat (VP) und je 2x Immunpräzipitat (IP) wurden 10 µM CX-4945, synthetisches Substratpeptid mit der spezifischen CK2-Sequenz RRRDDDSDDD in CK2-Reaktionsmix und zum Starten der Phosphorylierungsreaktion 10 µCi/500 µl [³²P]-γ-ATP gegeben. Die anderen beiden Vorpräzipitate (VP) und Immunpräzipitate (IP) wurden analog mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle anstatt CX-4945 behandelt, allerdings ohne Zugabe von synthetischem Substratpeptid. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert, auf P81 Ionenaustausch-Filterpapier übertragen und der *in vitro*-CK2-Kinasesassay analog Punkt 5.3.10 durchgeführt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Zur Auswertung wurde die Hintergrundstrahlung (Radioaktivitäten im Ansatz ohne Zelllysat) von jeder Probe abgezogen, die Werte des Vorpräzipitates (VP) vom jeweiligen Immunpräzipitat (IP) subtrahiert und die erhaltenen IP-Werte prozentual dargestellt.

Nachdem nun die CK2-Kinaseaktivität am Immunpräzipitat von USF2 durch einen spezifischen *in vitro*-CK2-Kinaseassay mit einem synthetischen Peptid bestätigt werden konnte, wurde durch ein weiteres Phosphorylierungsexperiment am USF2-Immunpräzipitat analysiert, ob die aktive CK2 das copräzipitierte USF1 phosphorylieren kann.

Dazu wurden INS-1-Zellen ausgesät und nach Zellernte und -lyse 6 mg Gesamtzellextrakt eingesetzt, um USF2 analog Punkt 5.3.9 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 2 Stunden bei 4°C rollend zu präzipitieren. Nach Waschen aller Ansätze wurde die Sepharose des Vorpräzipitates (VP) und Immunpräzipitates (IP) auf jeweils 3 Ansätze aufgeteilt, wobei zu einem Vor- und Immunpräzipitat als Kontrolle rekombinantes CK2-Holoenzym, zu einem anderen Vor- und Immunpräzipitat 10 µM CX-4945, und zu dem dritten Vor- und Immunpräzipitat DMSO als Lösungsmittelkontrolle gegeben wurde. Die Phosphorylierungsreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 5 µCi [³²P]-γ-GTP in 20 µl CK2

Kinasepuffer/Ansatz gestartet, und die Ansätze über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln (750 rpm) inkubiert. Die Verwendung von GTP als Phosphatdonor gilt hierbei als weiteres Spezifitätsmerkmal für die CK2, da sie eine der wenigen Kinasen ist, die dieses für Phosphorylierungsreaktionen akzeptiert [289]. Danach wurden alle Ansätze mindestens 8x mit PBS gewaschen und die Proteine nach Denaturierung bei 95°C zusammen mit einer Zellextraktkontrolle (ZE), einer Antikörperkontrolle (AK) und einer Sepharosekontrolle (S) in einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und autoradiographisch analysiert. Nach Abklingen der Radioaktivität konnte copräzipitiertes USF1 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 immunologisch nachgewiesen werden. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 15 dargestellt. Bei Betrachtung der verschiedenen langen Expositionen der radioaktiv-markierten Proteine lassen sich sowohl im Vor-, als auch im Immunpräzipitat zahlreiche Banden detektieren. Neben weiteren copräzipitierten Proteinen findet man eine deutliche Bande im Immunpräzipitat auf Höhe des USF1, die im Vorpräzipitat nicht nachweisbar ist. Diese Bandenintensität nimmt nach Zugabe von CX-4945 ab, ohne jedoch ganz zu verschwinden. Eine weitere deutliche Bande lässt sich am unteren Ende des Filmes in nahezu allen Spuren nachweisen, welche vermutlich die Autophosphorylierung der copräzipitierten CK2 β darstellt. Der Nachweis gleichmäßiger Mengen an copräzipitiertem USF1 in allen Ansätzen ist in der Western Blot Analyse in Abbildungsteil b gezeigt. Nach diesen beiden Experimenten am USF2-Immunpräzipitat kann somit geschlussfolgert werden, dass eine Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 auch an immunpräzipitierten USF-Proteinen in INS-1-Zellen durchgeführt werden kann und die an USF2 gebundene CK2 auch aktiv ist.

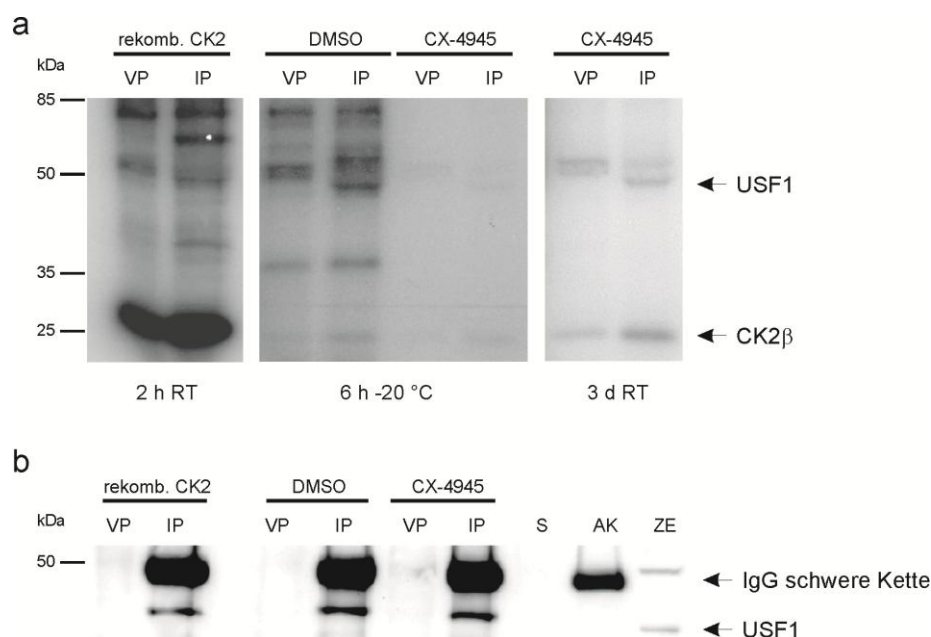


Abbildung 15: *In vitro*-Phosphorylierungsassay von USF1 durch CK2 am Immunpräzipitat von USF2 aus INS-1-Gesamtzellextrakt. Sechs mg Gesamtproteine im Zellextrakt aus INS-1-Zellen wurden zusammen mit einem Gemisch aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose des Vorpräzipitates (VP) und des Immunpräzipitates (IP) auf jeweils 3 Ansätze verteilt, wobei zu einem Vor- und Immunpräzipitat CK2-Holoenzym, zu einem anderen Vor- und Immunpräzipitat 10 µM CX-4945 und zu dem dritten Vor- und Immunpräzipitat DMSO als Lösungsmittelkontrolle gegeben wurde. Die Phosphorylierungsreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 5 µCi [³²P]-γ-GTP in 20 µl CK2 Kinasepuffer/Ansatz gestartet und die Ansätze über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Proteine wurden nach Denaturierung bei 95°C zusammen mit einer Zellextraktkontrolle (ZE), einer Antikörperkontrolle (AK) und einer Sepharosekontrolle (S) in einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. (a) Autoradiographie verschiedener langer Expositionen des Vor- (VP) und Immunpräzipitates (IP) des *in vitro*-Phosphorylierungsassays. (b) Die immunologische Sichtbarmachung von copräzipitiertem USF1 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229, sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. VP: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, ZE: Gesamtzellextrakt, AK: Antikörperkontrolle, S: Sepharosekontrolle, RT: Raumtemperatur, h: Stunden, d: Tage.

Die *in vitro*-Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 wurde nachfolgend noch *in vivo* durch Markierung mit [³²P]-Orthophosphorsäure in INS-1-Zellen überprüft. Dazu wurden INS-1-Zellen auf 100-mm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit phosphatfreiem Medium (+ entsprechende Mediumzusätze) gewaschen und anschließend für 2 Stunden in selbigem Medium gehungert. Zur radioaktiven Phosphat-Markierung wurden die Zellen für 4 Stunden mit 100 µCi [³²P]-Orthophosphorsäure in phosphatfreiem Medium (+ entsprechende Mediumzusätze) inkubiert, wobei ein Ansatz zusätzlich mit 10 µM CX-4945 und ein Ansatz mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle versetzt wurde. Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden 1.2 mg Extrakt mit einer Kombination aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-229), für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender Western Blot Analyse war es möglich, präzipitiertes, [³²P]-Phosphat-markiertes USF1 per Autoradiographie und anschließend immunologisch mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-229) nachzuweisen. Das Ergebnis der *in vivo*-Phosphorylierung ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Autoradiographie zeigt sowohl im DMSO behandelten Ansatz, als auch im CX-4945 behandelten Ansatz eine schwache Bande auf Höhe des USF1, wohingegen in der Präzipitationskontrolle (VP) kaum eine Bande zu erkennen ist. Die Bande im CX-4945 behandelten Ansatz ist zudem etwas schwächer als die im DMSO behandelten Ansatz. Per

Western Blot lassen sich aber annähernd gleiche Mengen an präzipitiertem USF1 in beiden Versuchsansätzen detektieren. Nach densitometrischer Auswertung der USF1-Banden in der Autoradiographie und im Western Blot mit der BioRad Quantity One® 1-D Analysis Software lässt sich eine Reduktion der USF1-Bande im CX-4945 behandelten Ansatz auf ca. 77% im Vergleich zu DMSO errechnen. Da also nach Hemmung der CK2-Aktivität weniger [³²P]-Phosphat-markiertes USF1 nachzuweisen ist, kann somit davon ausgegangen werden, dass USF1 auch *in vivo* durch die CK2 in INS-1-Zellen phosphoryliert wird.

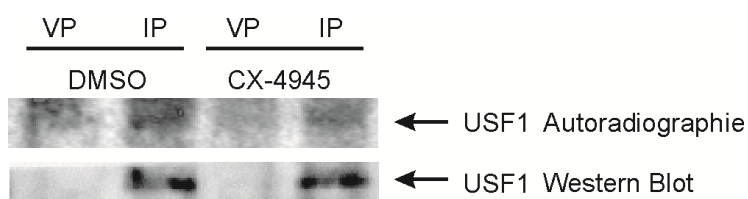


Abbildung 16: *In vivo*-Phosphorylierung von USF1 in INS-1-Zellen durch Markierung mit [³²P]-Orthophosphorsäure und paralleler Behandlung mit CX-4945 bzw. DMSO und anschließender USF1-Immunpräzipitation aus Gesamtzellextrakten. INS-1-Zellen wurden auf 100-mm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag für 2 Stunden in phosphatfreiem Medium gehungert. Zur radioaktiven Phosphat-Markierung wurden die Zellen anschließend für 4 Stunden mit 100 µCi [³²P]-Orthophosphorsäure inkubiert, wobei ein Ansatz zusätzlich mit 10 µM CX-4945 und ein Ansatz mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle versetzt wurde. Nach Ernte der Zellen wurden 1.2 mg Extrakt mit einer Kombination aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-229), für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse konnten die [³²P]-Phosphat-markierten Proteine per Autoradiographie, und präzipitiertes USF1 immunologisch mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 nachgewiesen werden. Die densitometrische Analyse erfolgte mit der BioRad Quantity One® 1-D Analysis Software.

Aus den Phosphorylierungsexperimenten am USF-Präzipitat konnten somit erste Hinweise auf eine mögliche USF1-Phosphorylierung durch die CK2 in den INS-1-Zellen getroffen werden, die durch eine *in vivo* Phosphorylierung in den pankreatischen β-Zellen durch Markierung mit [³²P]-Orthophosphorsäure bestätigt werden konnte.

6.3 Analyse eines Einflusses der USF1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Funktionen der USF-Proteine in INS-1-Zellen

Im nächsten Schritt stellte sich nun die Frage, ob die USF1-Phosphorylierung durch die CK2 einen Einfluss auf verschiedene biologische Funktionen der USF-Proteine und CK2 hat. Im ersten Schritt sollte deshalb die Interaktion von USF1 mit USF2 bzw. mit den beiden CK2-

Untereinheiten α und β in INS-1-Zellen in Abhängigkeit von einer CK2-Phosphorylierung untersucht werden.

Durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation wurde zunächst der Einfluss einer Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 auf die Zusammensetzung des USF/CK2-Komplexes untersucht. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wird eingesetzt, um einzelne Proteine einer Zelle aufgrund ihrer verschiedenen Dichte und Größe voneinander zu trennen. Nach Ultrazentrifugation befinden sich die Proteine innerhalb der Sucroseschicht, deren Konzentration in etwa der Dichte und Größe der Proteine entspricht. In einem ersten Versuchsansatz wurden je 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der Markerproteine Albumin (MW ~80 kDa), Casein (MW ~25 kDa) und IgG (MW ~144 kDa, nach Denaturierung: schwere Ketten ~50 kDa, leichte Ketten ~25 kDa) in PBS mit 1% Tween 20 gelöst und 1 Stunde bei 4°C rollend vorinkubiert. 200 μl dieser Lösung wurden auf einen Gradienten geschichtet, der linear von oben nach unten mit einer 5-10%igen Sucroslösung gegossen wurde. Nach Ultrazentrifugation wurden einzelne Fraktionen à 750 μl gesammelt und die jeweilige Dichte der Sucroslösung im Abbé-Refraktometer bestimmt, um die Linearität des gegossenen Sucrosegradienten zu überprüfen. Nach anschließender Proteinfällung mittels TCA, konnten die Proteine in den verschiedenen Fraktionen per SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend mit Coomassie Blau angefärbt werden. Die Verteilung der Markerproteine im Sucrosegradienten ist in Abbildung 17 dargestellt. Abbildungsteil a zeigt ein gleichmäßiges Austropfen des Gradienten. Bei Betrachtung des Coomassie Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgels in Abbildungsteil b erkennt man die schweren und leichten Ketten der heterotetrameren IgGs (MW ~150 kDa) vorwiegend in den Fraktionen 9-11, also bei einer Sucrosekonzentration von 5-5.5%. Albumin als klassisches Homodimer sedimentiert in den Fraktionen 13-15 (MW ~132 kDa), also bei etwa 4.5% Sucrose. Die kleinen Caseine (MW ~20-25 kDa), die vorwiegend als Monomere vorliegen, reichern sich bei Sucrosekonzentrationen von 3.5-4.5% (Fraktionen 14-16) an.

6. Ergebnisse

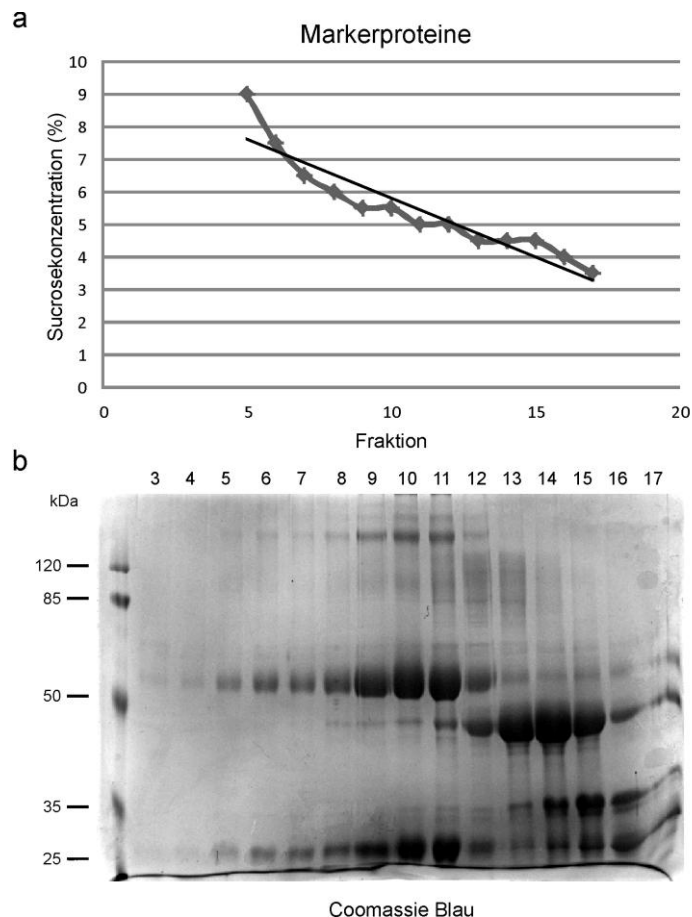


Abbildung 17: Coomassie Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der gefällten Markerproteine IgG, Albumin und Casein nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation. Ein Sucrosegradient von 5-10% Sucrose wurde mit einer einstündig vorinkubierten Lösung aus PBS mit 1% Tween 20 und je 1 µg/µl der Markerproteine Rinder-IgG, Albumin und Casein überschichtet und ultrazentrifugiert. Nach Austropfen einzelner Fraktionen à 750 µl wurde die Sucrosekonzentration jeder Fraktion mit dem Abbé-Refraktometer bestimmt und die Proteine anschließend mit TCA gefällt. Nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine innerhalb der verschiedenen Fraktionen mit Coomassie Blau angefärbt. (a) Die im Abbé-Refraktometer bestimmte Dichte der Sucroslösung wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Dabei konnte durch Bestimmung der Brechungsindizes der ausgetropften Fraktionen im Abbé-Refraktometer auf die entsprechende Sucrosekonzentration in der Fraktion geschlossen werden. (b) Coomassie Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel nach Elektrophorese der gefällten Proteine in den Fraktionen.

Nach den ersten Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens der Markerproteine wurden in einem nächsten Schritt die Dichtegradienten mit Gesamtzellextrakten aus INS-1-Zellen beladen, wobei die Zellen zuvor 24 Stunden entweder mit 10 µM CX-4945, oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden. Je 2 mg Gesamtproteine aus den DMSO- oder CX-4945 behandelten Zellen wurde auf einen 5-10%igen Sucrosegradienten geschichtet und dieser ultrazentrifugiert. Nach Austropfen einzelner Fraktionen à 750 µl wurde die Sucrosekonzentration jeder Fraktion im Abbé-Refraktometer bestimmt und anschließend die Proteine mittels TCA gefällt. Das so erhaltene Proteinpellet wurde mit 3x SDS-Probenpuffer gekocht,

in zwei Ansätze aufgeteilt und in zwei getrennten SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend per Western Blot auf die jeweilige PVDF-Membran transferiert. Auf dem einen Blot wurde USF1 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 bzw. CK2 α mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und CK2 β mit dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) nachgewiesen. Auf dem anderen Blot wurde USF2 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862, CK2 α mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und CK2 β mit dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) detektiert. Hierbei wurde zur Analyse von USF1 und USF2 ein separates Gel geladen, da beide Proteine aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichtes nicht in einer Western Blot Analyse gleichzeitig nachzuweisen sind. Abbildung 18 zeigt die Dichtegradientenzentrifugation von unterschiedlich behandelten INS-1-Zellen. Sowohl der DMSO-, als auch der CX-4945-Gradient zeigen nach Austropfen einen linearen Abfall der Sucrosekonzentration. Beim DMSO-Gradienten fällt die Sucrosekonzentration in Fraktion 5 von etwa 9% auf etwa 4.5% in Fraktion 15 (Abbildungsteil a). Der CX-4945-Gradient fällt etwas steiler ab von ca. 11% Sucrose in Fraktion 4 auf 4% Sucrose in Fraktion 15 (Abbildungsteil d). Nach biochemischem Proteinnachweis zeigt sich, dass sowohl USF1, als auch USF2 in beiden Ansätzen vorwiegend in den Fraktionen 11-13 (5-6% Sucrose) sedimentieren, wobei auch ein geringer Teil in den Fraktionen 6-8 (6-9% Sucrose) nachweisbar ist. CK2 α und CK2 β sind in beiden Ansätzen vergleichbar sedimentiert und eher bei höheren Sucrosekonzentrationen (> 9% Sucrose) detektierbar (Abbildungsteile b, c und e, f). Es zeigt sich in beiden Gradienten kein Unterschied im Sedimentationsverhalten der USF-Proteine und CK2 in Abhängigkeit von einer CK2-Phosphorylierung. Demnach scheint die Interaktion der USF-Proteine mit CK2 nicht durch eine CK2-Hemmung beeinflusst zu werden. Allerdings lässt sich durch diesen Versuch auch feststellen, dass es scheinbar sehr viele USF-Dimere geben muss, mit denen nur ein geringer Teil der CK2-Untereinheiten komplexiert vorliegt. Der größere Anteil der beiden CK2-Untereinheiten bildet höhermolekulare Formen aus, die vorwiegend als Holoenzym aus CK2 α und CK2 β oder CK2-Multimeren, und eventuell aus Komplexen mit weiteren Proteinen, vorliegen.

6. Ergebnisse

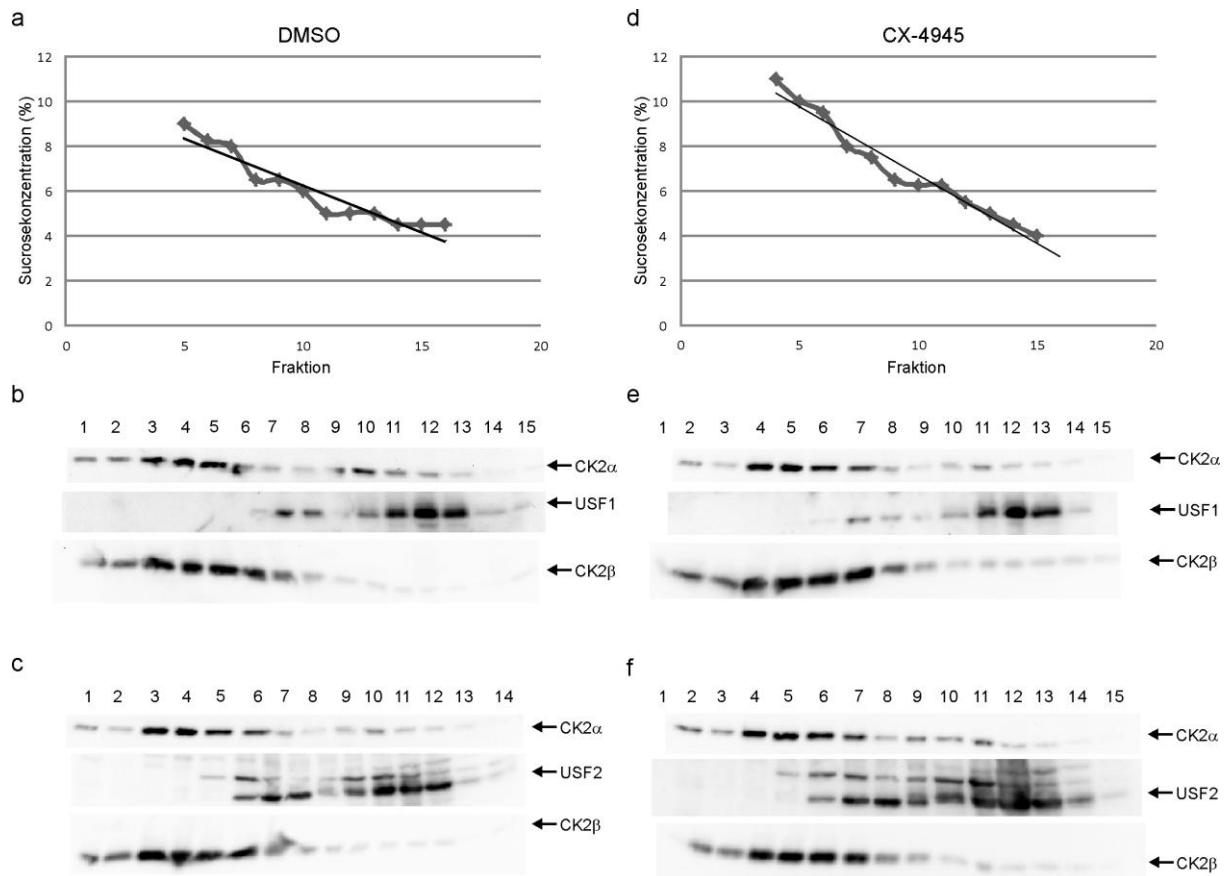


Abbildung 18: Western Blot Analyse von gefällten Proteinen aus CX-4945 bzw. DMSO behandelten INS-1-Zellen nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation. Ein Sucrosegradient von 5-10% Sucrose wurde mit 2 mg Gesamtproteinen aus INS-1-Zellen, die entweder 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945 (d-f) oder 24 Stunden mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle (a-c) behandelt wurden, überschichtet und ultrazentrifugiert. (a)+(d) Nach Austropfen einzelner Fraktionen à 750 μ l wurde die jeweilige Sucroседichte in jeder Fraktion mit dem Abbé-Refraktometer bestimmt. Dabei konnte durch Bestimmung der Brechungsindizes der ausgetropften Fraktion im Abbé-Refraktometer auf die entsprechende Sucrosekonzentration in der Fraktion geschlossen werden. Die Proteine wurden anschließend mit TCA gefällt. Nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western Blot, wurde in (b)+(e) USF1 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-229 detektiert, und in (c)+(f) USF2 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 nachgewiesen. CK2 α wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und CK2 β wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) nachgewiesen ((b), (c), (e) und (f)).

Nachdem mithilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten der USF-Proteine und CK2 in Abhängigkeit von einer USF1-Phosphorylierung in INS-1-Zellen festzustellen waren, wurde nun der Einfluss der CK2 auf die Interaktion von USF1 und USF2 mit einem anderen Verfahren noch einmal untersucht. Zur Analyse des CK2-Effektes auf die Komplexbildung beider USF-Proteine wurde erneut ein Duolink® *In Situ* „Proximity Ligation Assay“ (PLA), analog zur Untersuchung der Interaktion der USFs mit CK2, durchgeführt. Für den Versuch wurden auf Deckgläschen

ausgesäte INS-1-Zellen 24 Stunden entweder mit 10 μ M CX-4945, oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Fixierung der Zellen wurden diese einer Doppelfärbung mit dem primären monoklonalen Maus-Antikörper gegen USF1 (sc-390027) und dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), sowie zur Angabe der Spezifität mit den Einzelantikörpern gegen USF1 und USF2, als auch nur mit den PLA Proben unterzogen (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 19 a ist zu erkennen, dass die Doppelfärbungen der USF-Proteine eine Vielzahl von Spots innerhalb der Zellkerne zeigen, welche für eine eindeutige Assoziation beider Proteine in den INS-1-Zellen unabhängig von einer Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 stehen. Zur besseren Übersicht der mengenmäßigen Verteilung der Spots in den einzelnen Versuchsansätzen, wurden die Spots von vier Aufnahmen verschiedener Bereiche auch in diesem Versuch komplett ausgezählt und ihre Anzahl pro Zelle bestimmt. Anschließend wurde die Spotanzahl in je 50 Zellen errechnet und für die Doppelfärbungen graphisch in Abbildung 19 b dargestellt. Die Auszählung der Spots zeigt statistisch signifikant, dass deutlich mehr Interaktionen von USF1 und USF2 innerhalb der Zelle stattfinden, wenn die CK2-Aktivität gehemmt wird. Demnach scheint eine Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 die Interaktion beider USF-Proteine negativ zu beeinflussen. Dass sich dieser Effekt nicht per Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation nachweisen ließ, kann möglicherweise daran liegen, dass der PLA-Assay eine sensitivere Methode zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen darstellt.

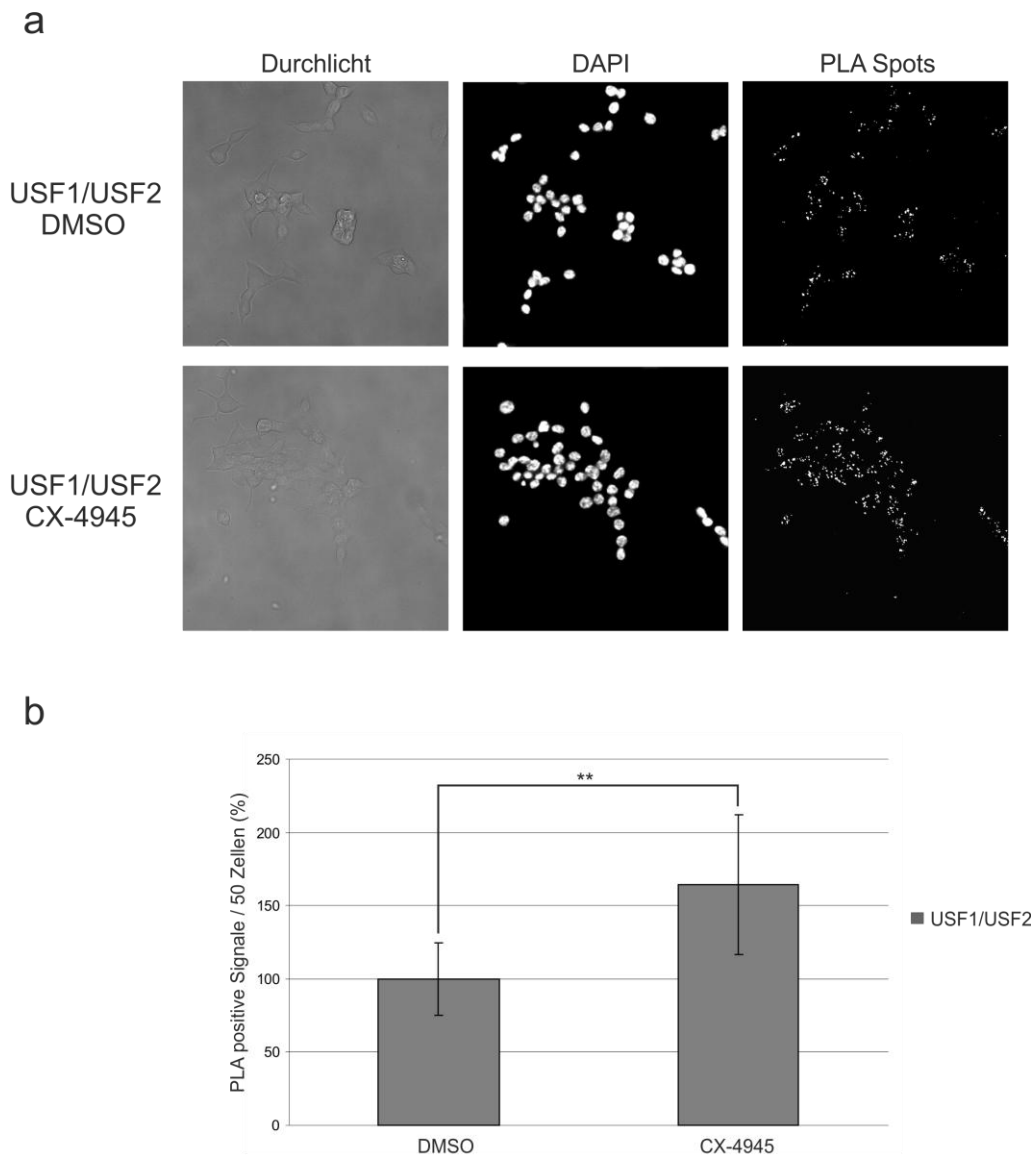


Abbildung 19: Duolink® *In Situ* „Proximity Ligation Assay“ (PLA) der USF-Proteine nach vorheriger Behandlung von INS-1-Zellen mit CX-4945 bzw. DMSO. (a) INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit 10 μ M CX-4945, oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und nach dem Fixieren der Zellen wurden Doppelfärbungen von USF1 (monoklonaler Maus-Antikörper sc-390027) und USF2 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-862) durchgeführt. DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Bilder wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40x Öl). (b) Zur besseren Übersicht der mengenmäßigen Verteilung der Spots in den einzelnen Versuchsansätzen wurden die Spots von 4 Aufnahmen verschiedener Bereiche komplett ausgezählt und ihre Anzahl pro Zelle bestimmt. Anschließend wurde die Spotanzahl in je 50 Zellen errechnet und die Spots in 50 Zellen der DMSO-Kontrolle 100% gesetzt und der CX-4945 behandelte Ansatz analog ausgewertet. Das Balkendiagramm zeigt die Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf DMSO bestimmt, wobei ** signifikant verschieden von DMSO mit $p < 0.01$ ist.

Nachdem nun nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation kein Einfluss der CK2 auf die Dimerisierung der USF-Proteine festgestellt werden konnte, der PLA-Assay aber ein anderes Ergebnis zeigte, wurde erneut ein weiteres Verfahren in INS-1-Zellen zur Überprüfung eines CK2-Einflusses angewandt. Per Coimmunpräzipitation wurde analysiert, ob es nach CK2-Hemmung einen Effekt auf die Interaktion von USF1 und USF2 gibt. Dazu wurden INS-1-Zellen für 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Zur besseren Beurteilung der Spezifität der Hemmstoffe für eine CK2-Inhibition wurde der Versuch mit INS-1-Zellen wiederholt, die mit 50 μ M Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle, oder mit 50 μ M TBB bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden. Nach Herstellung von Zellkernextrakten wurden für alle 3 unabhängigen Versuche stets 2 mg Zellkernextrakt mit einer Kombination aus Protein-G- und CL-4B-Sephrose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit der entsprechenden Präzipitationskontrolle (VP), sowie nachfolgender Western Blot Analyse war es möglich, mit USF2 copräzipitiertes USF1 nachzuweisen. Das Ergebnis der Coimmunpräzipitation ist in Abbildung 20 a-c dargestellt. Wie schon in Abbildung 11 gezeigt, ist USF1 im Komplex mit USF2 in allen Ansätzen stets copräzipitierbar und deutlich nachzuweisen. Werden nun die Proteinmengen an copräzipitiertem USF1 jedes Hemmexperimentes in den Hemmstoff behandelten Ansätzen mit dem entsprechenden DMSO behandelten Ansatz verglichen, zeigt sich, dass nach CK2-Hemmung mehr USF1 copräzipitiert werden kann. Dies lässt sich vor allem nach Behandlung mit den CK2-Inhibitoren Quinalizarin und TBB nachweisen, während die Effekte nach Behandlung mit CX-4945 hingegen etwas schwächer ausfallen. Somit können die Ergebnisse des PLA-Assays auch durch CK2-Hemmung und anschließender Coimmunpräzipitation bestätigt werden: Nach Hemmung der CK2-Aktivität in INS-1-Zellen binden USF1 und USF2 besser aneinander.

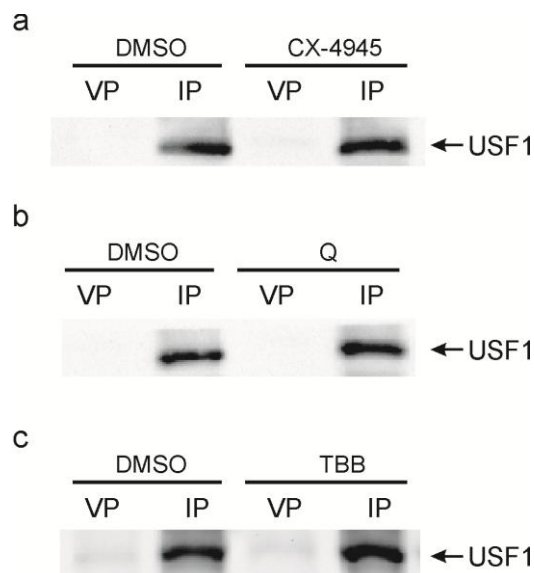


Abbildung 20: Coimmunpräzipitation der USF-Proteine aus INS-1-Zellkernextrakten nach CK2-Hemmung der INS-1-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren. INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden entweder (a) mit 10 μ M CX-4945, (b) mit 50 μ M Quinalizarin oder (c) mit 50 μ M TBB bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Zellernte und Herstellung von Zellkernextrakten wurden jeweils 2 mg Gesamtproteine im Zellkernextrakt zusammen mit einem Gemisch aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert, zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (VP) in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Sichtbarmachung des copräzipitierten USF1 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-8683), sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. VP: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat.

Als klassische Transkriptionsfaktoren ist es die Aufgabe der USF-Proteine, an DNA zu binden und Genexpressionen zu aktivieren oder zu reprimieren [43]. Da die Transkriptionsfaktoraktivität die wichtigste Funktion der USFs darstellt, wurden die Effekte der Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 auf die Promotoren verschiedener Gene in INS-1-Zellen überprüft. Dabei wurde sich zunächst Reporterkonstrukten bedient, von denen in der Literatur zum einen bereits bekannt war, dass die USF-Proteine an deren Promotor binden, und zum anderen, dass sie deren Aktivität USF-abhängig regulieren [102, 244, 304, 305]. Diese wurden so zunächst als Modelle für einen CK2-Einfluss auf USF-abhängige Transaktivierungsprozesse verwendet.

Dazu wurden INS-1-Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukt (Hämoxxygenase-1: pHOGL3/4.5, Fettsäuresynthase: pGL3-rFAS-promLuc) und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 oder dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits

transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse, wurde die Expression des transfizierten USF1-Expressionsplasmids überprüft (monoklonaler Maus-Antikörper Anti-FLAG M2) und als Ladekontrolle α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) nachgewiesen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten des USF1 transfizierten und DMSO behandelten Ansatzes 100% gesetzt und die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet.

Die Ergebnisse des Reporterassays für den Hämoxygenasepromotor 1 (HO-1) sind in Abbildung 21 a dargestellt. Analog zur Literatur lässt sich, wenn auch moderat, eine Zunahme der relativen Promotoraktivität durch USF1 verzeichnen, welche allerdings nicht signifikant ist. Nach Hemmung der CK2 lässt sich die Aktivität des HO-1 Promotors Hemmstoff-spezifisch verstärken. Während nur ein schwacher Effekt einer CK2-Inhibition durch CX-4945 auf die Aktivität des Promotors zu verzeichnen ist, lässt sich die Aktivität nach Hemmung durch TBB und Quinalizarin signifikant verstärken. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die CK2 einen negativen Einfluss auf die USF1-abhängige Regulation der HO-1 Expression in INS-1-Zellen nimmt, und eine CK2-Hemmung die Transaktivierung des Hämoxygenasepromotors durch USF1 verstärkt. Die Expression des transfizierten FLAG-USF1 aus einem Versuch ist exemplarisch im Abbildungsteil b aufgezeigt.

6. Ergebnisse

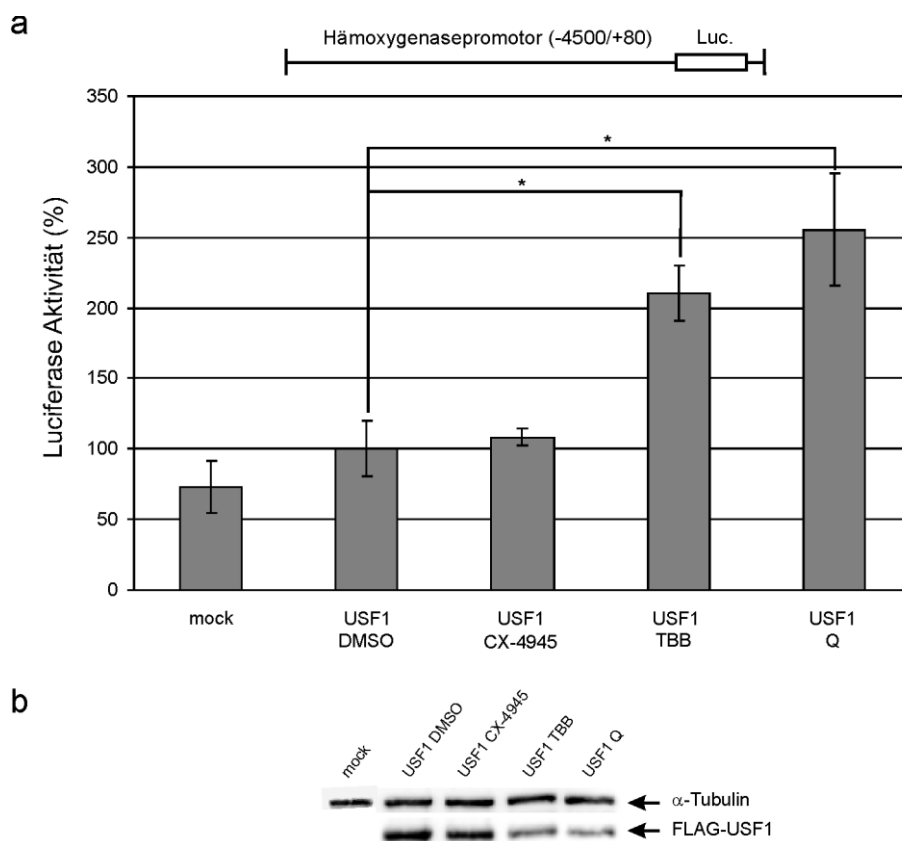


Abbildung 21: USF1-Effekt nach CK2-Hemmung auf die relative Hämoxxygenasepromotor Aktivität in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem Hämoxxygenasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pHOGL3/4.5 und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 normiert, die Luciferase Aktivitäten der USF1 transfizierten und mit DMSO behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, und die übrigen Ansätze darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf USF1 DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von USF1 DMSO mit $p < 0.05$ ist.

Die Ergebnisse des Reporterassays der Fettsäuresynthase (FAS) sind in Abbildung 22 a dargestellt. Analog zur Literatur lässt sich auch hier eine Zunahme der relativen Fettsäuresynthasepromotoraktivität nach Transfektion von USF1 erkennen, auch wenn sie relativ schwach und ebenfalls nicht signifikant ist. Eine weitere und nun auch signifikante Zunahme der relativen Fettsäuresynthasepromotoraktivität zeigt sich nach Behandlung mit

allen CK2-Hemmstoffen. Demzufolge führt auch bei der Expression der Fettsäuresynthase eine Hemmung der CK2 zu einer noch stärkeren Transaktivierung des Promotors und zeigt deutlich, dass auch die Expression der Fettsäuresynthase USF1- und CK2-abhängig reguliert wird. Die Expression des transfizierten FLAG-USF1 ist auch hier exemplarisch aufgezeigt (Abbildung 22 b).

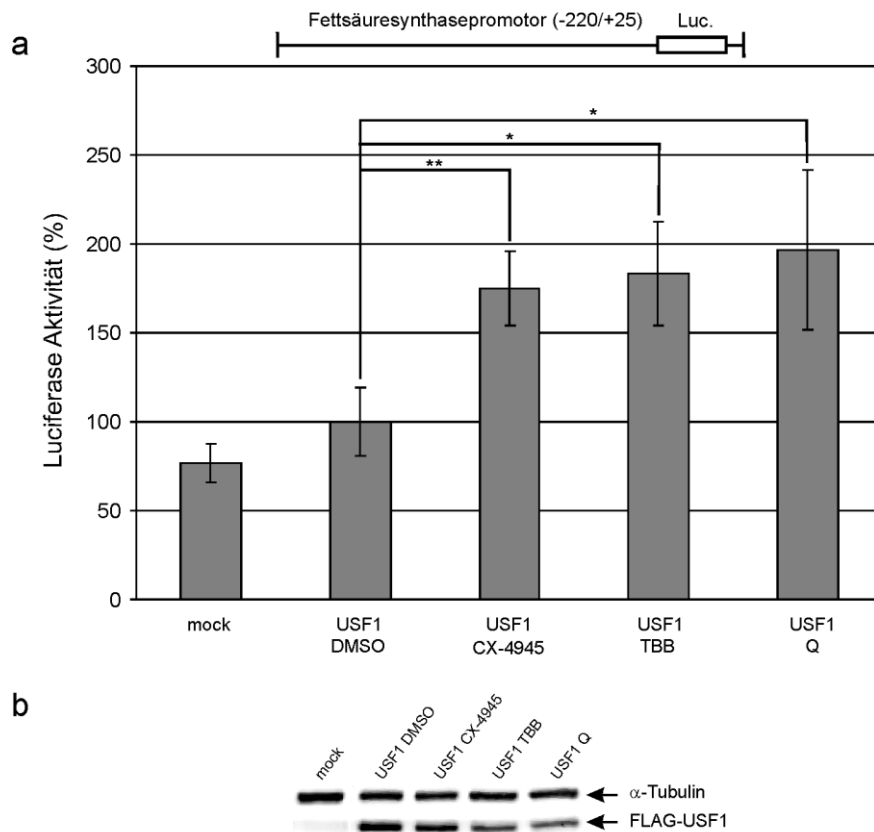


Abbildung 22: USF1-Effekt nach CK2-Hemmung auf die relative Fettsäuresynthasepromotor Aktivität in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem Fettsäuresynthasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pGL3-rFAS-promLuc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 normiert, die Luciferase Aktivitäten der USF1 transfizierten und mit DMSO behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, und die übrigen Ansätze darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf USF1 DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von USF1 DMSO mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von USF1 DMSO mit $p < 0.01$ ist.

Nachdem CK2-Effekte bei der USF1-abhängigen Regulation der Modellgene HO-1 und FAS identifiziert wurden, war es interessant zu untersuchen, ob die CK2 auch einen Einfluss auf USF1-regulierte Gene in den pankreatischen β -Zellen nimmt. In den pankreatischen β -Zellen gelten vor allem die Glucokinase, PDX-1 und Insulin als wichtige Gene beim Erhalt der zellulären Glucosehomöostase [12]. Somit ist die Analyse eines Einflusses der CK2 auf deren USF1-abhängige Aktivität notwendig, um die Frage nach der Funktion der Proteinkinase CK2 bei der Regulation des Glucosemetabolismus in den pankreatischen β -Zellen zu klären. Hierzu wurden INS-1-Zellen, analog zu den Reporteranalysen der Hämoxygenase-1 und Fettsäuresynthase, mit dem entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukt (Glucokinase: pGL3-GK-1448-Luc, PDX-1: -6500-STF-luc, Insulin: pGEM3ZFM-RIP1-POLYA) und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 oder dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect[®] oder ViaFect[™] Kits transfiziert und nach 24 Stunden entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse wurde die Expression des transfizierten USF1-Expressionsplasmids überprüft (monoklonaler Maus-Antikörper Anti-FLAG M2) und als Ladekontrolle α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) nachgewiesen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten des USF1 transfizierten und DMSO behandelten Ansatzes 100% gesetzt, die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet, und das Ergebnis als Balkendiagramm (und zur besseren Darstellung gegebenenfalls in Form einer gebrochenen y-Achse) dargestellt.

In Abbildung 23 a ist das Ergebnis des Reporterassays für den pankreatischen Glucokinasepromotor dargestellt, für welchen ebenso bereits eine positive Wirkung der USFs auf seine Aktivität bekannt ist [187]. Wie sich erkennen lässt, wird der Promotor nach Transfektion von USF1 auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen signifikant angeschaltet. Es zeigt sich eine fast zweieinhalbfach höhere Luciferase-Aktivität im USF1 transfizierten und DMSO behandelten Ansatz im Vergleich zum mock transfizierten Ansatz. Werden die

Zellen zusätzlich noch mit verschiedenen CK2-Hemmstoffen behandelt, zeigt sich, dass sich diese Transaktivierung noch weiter verstärken lässt. Dieser Effekt ist für alle Hemmstoffe nachweisbar, wobei CX-4945 die größte, und TBB die geringste Wirkung zeigt. Demnach scheint die USF1-abhängige Transaktivierung des pankreatischen Glucokinasepromotors besser stattzufinden, wenn USF1 nicht durch die CK2 phosphoryliert wird und zeigt auf, dass die CK2 nicht nur die Aktivität der Reportergene HO-1 und FAS negativ reguliert, sondern auch einen negativen Einfluss auf die Transkription der pankreatischen Glucokinase hat. Der biochemische Nachweis des transfizierten FLAG-USF1 eines Experiments ist beispielhaft per Western Blot Analyse in Abbildung 23 b gezeigt.

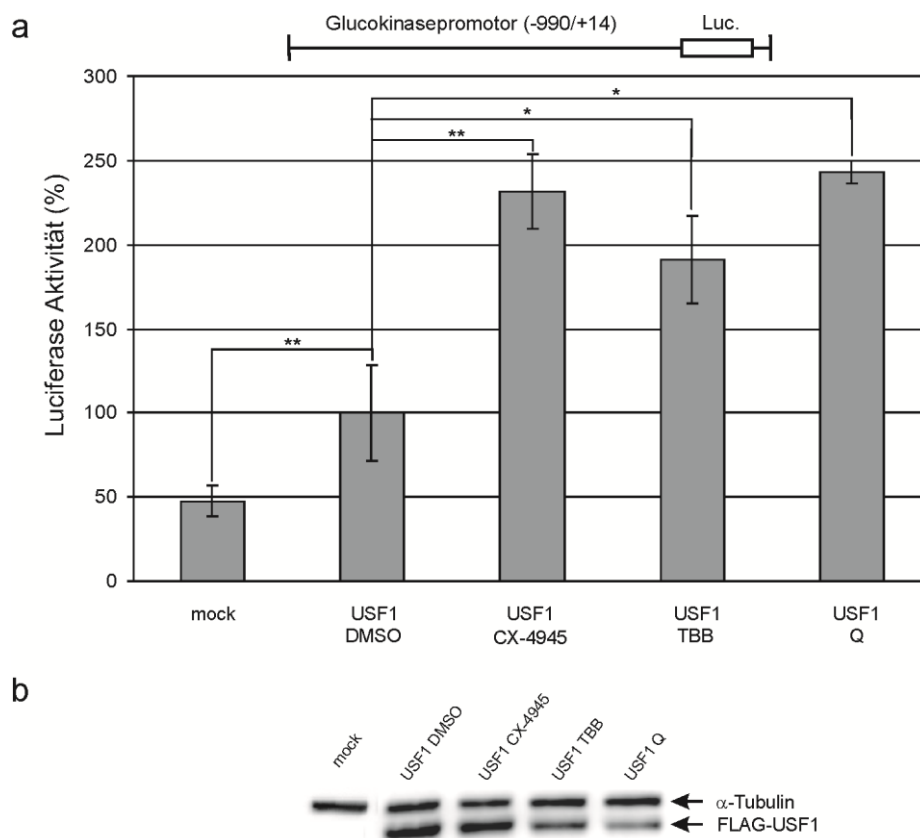


Abbildung 23: USF1-Effekt nach CK2-Hemmung auf die relative Glucokinasepromotoraktivität in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem Glucokinasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pGL3-GK-1448-Luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 oder dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 µM CX-4945, 50 µM TBB oder 50 µM Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 normiert, die Luciferase Aktivitäten der USF1 transfizierten und mit DMSO behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, und die übrigen Ansätze darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b)

6. Ergebnisse

Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und auf α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bzw. USF1 DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.01$ ist.

Was die beiden Gene PDX-1 und Insulin betrifft, werden die USF-Proteine in der Literatur überwiegend als Aktivatoren der jeweiligen Promotoren diskutiert [224, 228, 315]. Die Analysen in der vorliegenden Arbeit hingegen zeigen, dass USF1 nach Überexpression nicht nur Genexpressionen in Gang setzt, sondern diese auch hemmen kann. Die Ergebnisse der Transfektion von USF1 zeigen in dem hier verwendeten Zellsystem für beide Promotoren eine stark hemmende Wirkung, die auch statistisch hochsignifikant ist. Die relative Promotoraktivität von Insulin sinkt um das fünfeinhalbfache im Vergleich zum jeweiligen mock transfizierten Ansatz (Abbildung 24 a). Nach CK2-Hemmung lassen sich aber auch hier, in Analogie zu den vorherigen Reporteranalysen, signifikante Effekte auf die Insulinpromotoraktivität feststellen. Die USF1-abhängige Repression wird durch die fehlende CK2-abhängige USF1-Phosphorylierung durch alle Inhibitoren abgeschwächt, was bedeutet, dass mit abnehmender USF1-Phosphorylierung auch die Repression der Insulinpromotoraktivität abnimmt. Diese Minderung der USF1-abhängigen Repression des Insulinpromotors weist also auch hier auf einen negativen CK2-Einfluss auf USF1-abhängige Genexpressionen hin. Die Expression des transfizierten FLAG-USF1 ist auch hier per Western Blot überprüft und exemplarisch dargestellt (Abbildung 24 b).

6. Ergebnisse

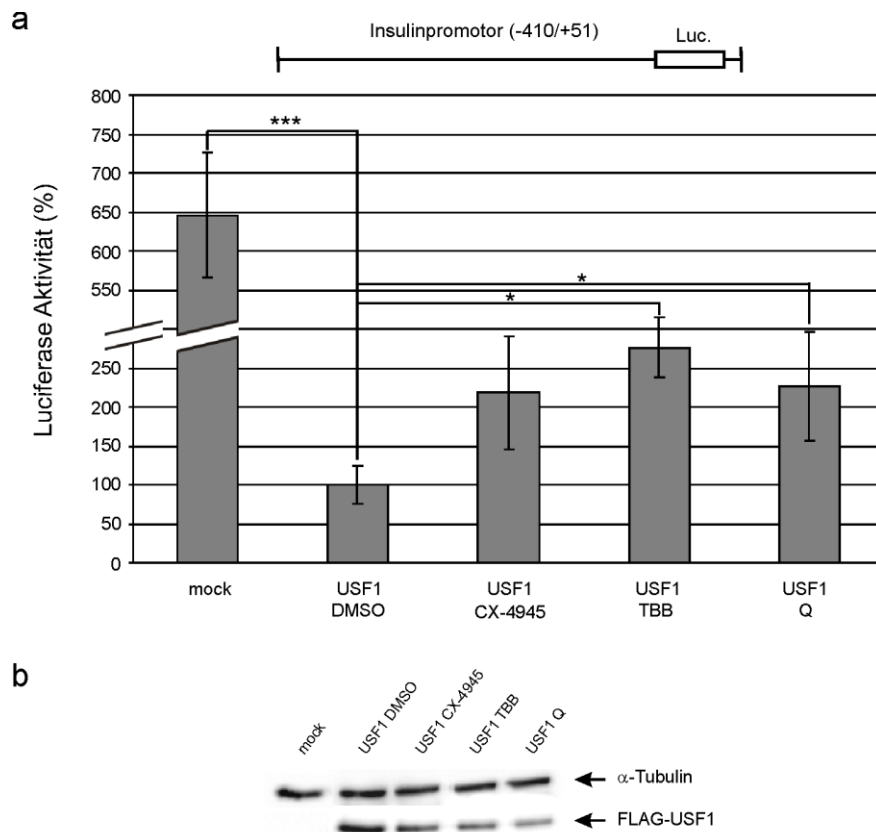


Abbildung 24: USF1-Effekt nach CK2-Hemmung auf die relative Insulinpromotor Aktivität in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pGEM3ZFM-RIP1-POLYA und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des ViaFect™ Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 normiert, die Luciferase Aktivitäten der USF1 transfizierten und mit DMSO behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, die übrigen Ansätze darauf bezogen und die y-Achse gebrochen dargestellt. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transkribiertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bzw. USF1 DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.05$, ** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.01$ und *** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.001$ ist.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der PDX-1 Reporteranalyse zeigt sich, dass die relative Promotoraktivität von PDX-1 um das siebenfache im Vergleich zum jeweiligen mock transfizierten Ansatz sinkt (Abbildung 25 a), ähnlich wie dies auch für den Insulinpromotor der Fall war. Wird auch hier die CK2-Aktivität durch verschiedene Hemmstoffe inhibiert,

lassen sich Hemmstoff-spezifische Effekte feststellen. Während nur ein schwacher Effekt einer CK2-Inhibition durch CX-4945 auf die Aktivität des Promotors zu verzeichnen ist, fallen die Effekte nach Hemmung mit Quinalizarin und TBB deutlicher aus. Die Repression der PDX-1 Promotoraktivität lässt sich nach Hemmung durch TBB und Quinalizarin signifikant mindern. Demnach kann auch am PDX-1 Promotor davon ausgegangen werden, dass die CK2 Einfluss auf die USF1-abhängige Regulation der PDX-1 Transkription in INS-1-Zellen nimmt, wobei auch hier eine CK2-Hemmung die USF1-abhängige Transrepression der PDX-1 Promotoraktivität abschwächt. Die Expression des transfizierten FLAG-USF1 ist auch hier per Western Blot überprüft und exemplarisch dargestellt (Abbildung 25 b).

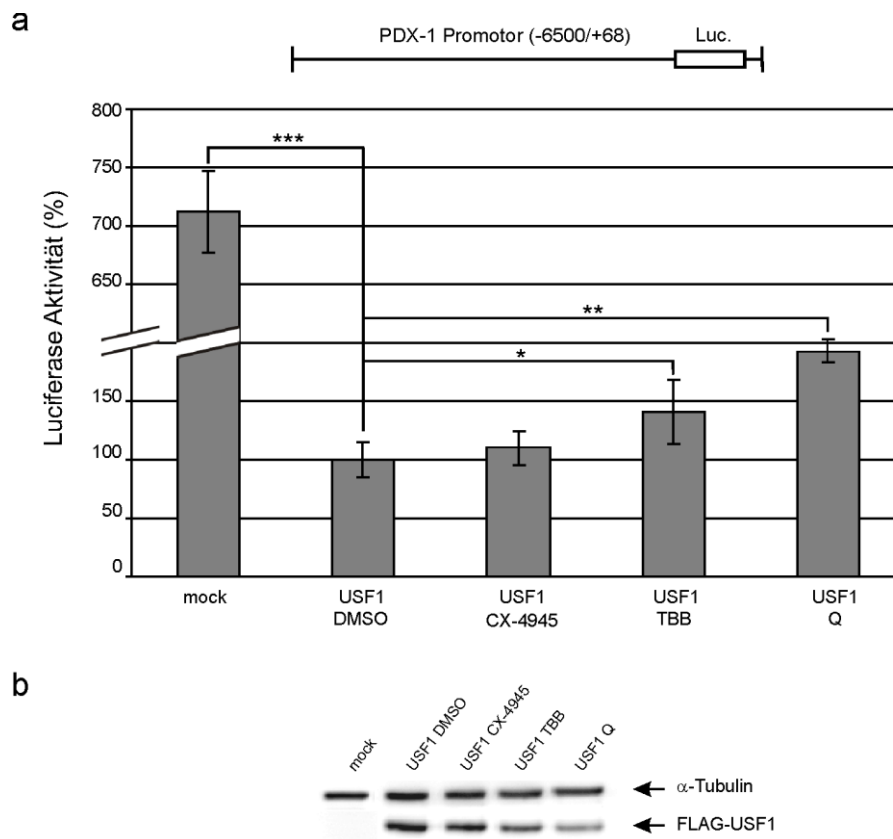


Abbildung 25: USF1-Effekt nach CK2-Hemmung auf die relative PDX-1 Promotor Aktivität in INS-1-Zellen. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des ViaFect™ Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 normiert, die Luciferase Aktivitäten der USF1 transfizierten und mit DMSO behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, die übrigen Ansätze darauf bezogen und die y-Achse gebrochen

dargestellt. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bzw. USF1 DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.05$, ** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.01$ und *** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 DMSO mit $p < 0.001$ ist.

Zusammenfassend kann für diesen Teil der Arbeit geschlussfolgert werden, dass zwar nur ein sehr geringer Teil von USF1 und USF2 mit CK2 partiell cosedimentieren, die Aktivität der CK2 aber keinen Einfluss auf ihre Komplexbildung mit den USF-Proteinen zu nehmen scheint. Allerdings beeinflusst die CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 die Dimerisierung und Transkriptionsfaktoraktivität der USF-Proteine. Zum einen konnte so in INS-1-Zellen per PLA-Assay und Coimmunpräzipitation gezeigt werden, dass nach Hemmung der CK2-Aktivität die Interaktion von USF1 und USF2 besser stattfindet, und zum anderen, dass Genexpressionen durch eine CK2-abhängige USF1-Phosphorylierung negativ beeinflusst werden. Die Transaktivierung der Hämoxygenase-1, der Fettsäuresynthase und der Glucokinase durch USF1 können so einerseits durch CK2-Hemmung noch weiter gesteigert werden, während andererseits am PDX-1- und Insulinpromotor durch USF1 eine Genrepression festgestellt werden konnte, welche durch CK2-Hemmung abgeschwächt wird.

6.4 Analyse eines Glucose-Einflusses auf die Funktionen der USF-Proteine und CK2 in INS-1-Zellen

In der Literatur sind zum einen Daten vorhanden, die zeigen, dass die USF-Proteine eine Vielzahl von Genen, wie zum Beispiel PDX-1 oder Insulin, im Glucosemetabolismus Glucose-abhängig regulieren [112, 126, 141, 172, 187, 219, 228], als auch Daten, die Effekte von Glucose auf die Aktivität der CK2 [314], und vor allem auch auf PDX-1 in den pankreatischen β -Zellen belegen [57, 157]. Nachdem der Einfluss einer Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 auf die Funktionen der USF-Proteine in INS-1-Zellen geklärt war, galt es als nächstes festzustellen, ob es Auswirkungen von Glucose auf die Funktionen der USF-Proteine und CK2 gibt. Dabei wurde zunächst überprüft, ob es einen Unterschied in der subzellulären Lokalisation der USFs, der CK2-Untereinheiten und von PDX-1 nach Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen gibt. INS-1-Zellen wurden dafür über Nacht in Glucose-freiem Medium gehungert und anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM (Glucosekarenz), 5 mM (Normoglucose) oder 25 mM (Hochglucose) Glucose

behandelt. Nach Zellernte wurden Zellkern- (KE) und Cytoplasmaextrakte (Cyto) hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt, und die einzelnen Proteine immunologisch mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. In Abbildung 26 ist das Ergebnis eines Versuches exemplarisch dargestellt. Der Nachweis von Nucleolin als Zellkernmarker und α -Tubulin als cytoplasmatisches Protein im Abbildungsteil a zeigt, dass die Zellfraktionierung der INS-1-Zellen zu einer guten Anreicherung von Zellkern- und Cytoplasmaproteinen geführt hat. Sowohl USF1, USF2, PDX-1, als auch alle CK2-Untereinheiten konnten unabhängig von der Glucosekonzentration in den Glucose-sensitiven INS-1-Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich auch hier (Abbildung 26 c), dass die Transkriptionsfaktoren USF1, USF2 und PDX-1 fast ausschließlich im Zellkern der INS-1-Zellen nachzuweisen sind, wohingegen beide CK2-Untereinheiten im Zellkern und im Cytoplasma, und vornehmlich cytoplasmatisch, lokalisiert sind. Diese Lokalisation scheint auch unabhängig von der Glucosekonzentration der Zellen stattzufinden.

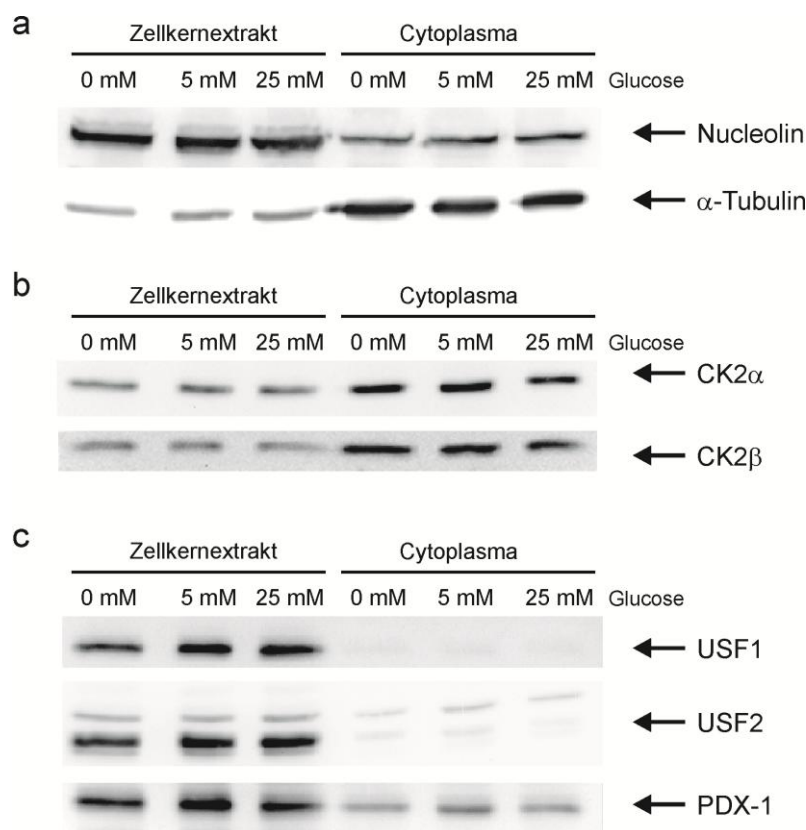


Abbildung 26: Biochemischer Nachweis der USF-Proteine, PDX-1 und der CK2-Untereinheiten nach Behandlung von INS-1-Zellen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen für 4 Stunden und nachfolgender Zellfraktionierung. INS-1-Zellen wurden über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und anschließend 4 Stunden entweder mit 0 mM (Glucosekarenz), 5 mM (Normoglucose) oder 25 mM (Hochglucose) Glucose behandelt. Nach Zellernte und -fraktionierung wurden 50 μ g INS-1-Zellkern- und Cytoplasmaextrakt auf einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse (a)

als Kontrolle für eine Zellfraktionierung mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α -Tubulin als Cytoplasmamarker, und mit dem Kaninchen-Serum #36 gegen Nucleolin als Zellkernmarker versehen. (b) Der monoklonale Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α und der monoklonale Maus-Antikörper E-9 (sc-46666) gegen CK2 β wurden zum Nachweis der CK2-Untereinheiten verwendet. (c) Der Nachweis von USF1 und USF2 wurde mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern (sc-8683 für USF1 und sc-862 für USF2) durchgeführt, PDX-1 wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und ein Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht.

Da die Lokalisation der untersuchten Proteine in INS-1-Zellen unabhängig von der Glucosekonzentration ist, stellte sich die Frage, ob Glucose die Aktivität der USFs oder CK2 beeinflusst. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Montenarh in den murinen pankreatischen β -Zellen MIN6 konnte bereits gezeigt werden, dass die CK2-Aktivität durch Glucose gesteigert wird [314]. Deshalb war es naheliegend auch in INS-1-Zellen zu analysieren, ob auch dort die CK2-Aktivität durch Glucose ansteigt. Für diese Untersuchungen wurden INS-1-Zellen erneut über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und anschließend für 4 Stunden Glucosekonzentrationen von 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM ausgesetzt. Nach Zellernte und Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden diese für die Durchführung eines *in vitro*-CK2-Kinaseassays analog Punkt 5.3.10 eingesetzt. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm in Abbildung 27 mit den Aktivitäten auf 0 mM Glucose bezogen, prozentual dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es eine signifikante Aktivitätssteigerung der CK2 nach Stimulation mit Glucose gibt. Dieser Effekt ist bei 5 mM Glucose am größten und bei höheren Konzentrationen wieder etwas rückläufig. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Glucose einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität der CK2 hat, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser auf geringe Mengenunterschiede der CK2-Untereinheiten bei verschiedenen Glucosekonzentrationen zurückzuführen ist (siehe Abbildung 26).

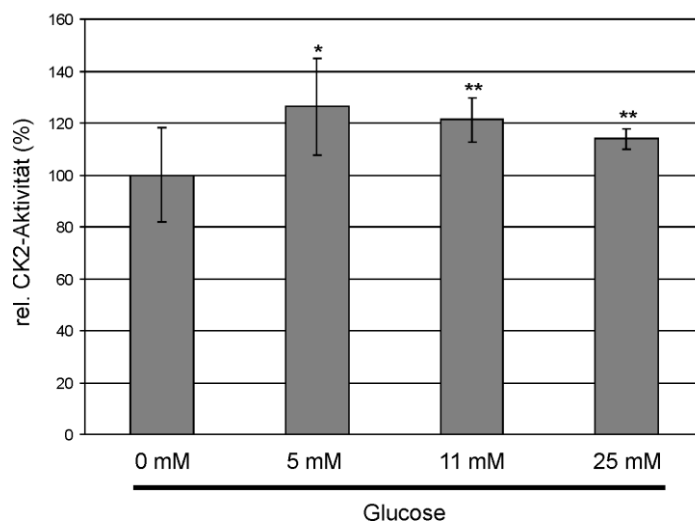


Abbildung 27: *In vitro*-CK2-Kinaseassay in Gesamtzellextrakten von INS-1-Zellen, die 4 Stunden unter unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose kultiviert wurden. INS-1-Zellen wurden nach nächtlichem Glucoseentzug einer vierstündigen Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen von 0 mM bis 25 mM Glucose unterzogen. Nach Herstellung von Zelllysaten wurde der Einfluss von Glucose auf die Aktivität der im Zellextrakt enthaltenen CK2 mithilfe eines spezifischen *in vitro*-CK2-Kinaseassays bestimmt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf 0 mM Glucose bestimmt, wobei * signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.01$ ist.

Nachdem ein Einfluss von Glucose auf die CK2-Aktivität in INS-1-Zellen zu beobachten war, wurde weiterführend analysiert, ob es einerseits einen Effekt auf die Interaktion von USF1 und USF2, als auch andererseits einen Effekt auf die Interaktion der USFs mit beiden CK2-Untereinheiten in Abhängigkeit verschiedener Glucosekonzentrationen gibt. Dazu wurden INS-1-Zellen erneut über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Tag für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose inkubiert. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 2 mg Zellkernextrakt mit einer Kombination aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese mit den entsprechenden Kontrollen (50 µg Zellkernextrakt (KE) und Präzipitationskontrolle (VP)), sowie nachfolgender Western Blot Analyse war es möglich, mit USF2 copräzipitierte Proteine nachzuweisen (Abbildung 28). Mit Antikörpern gegen USF1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-8683), CK2α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und CK2β (monoklonaler Maus-Antikörper E-9, sc-46666) lassen sich USF1 und beide CK2-Untereinheiten unabhängig von der Glucosekonzentration in allen Ansätzen detektieren. Dabei zeigt sich, dass etwa gleiche Mengen an USF1 mit USF2 bei allen Glucose-

konzentrationen copräzipitiert werden. CK2 α und CK2 β lassen sich, wenn auch sehr schwach, ebenso bei allen Glucosekonzentrationen gleichermaßen nachweisen. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass Glucose keinen Einfluss auf die USF1/USF2 und USF/CK2-Interaktion in INS-1-Zellen nimmt.

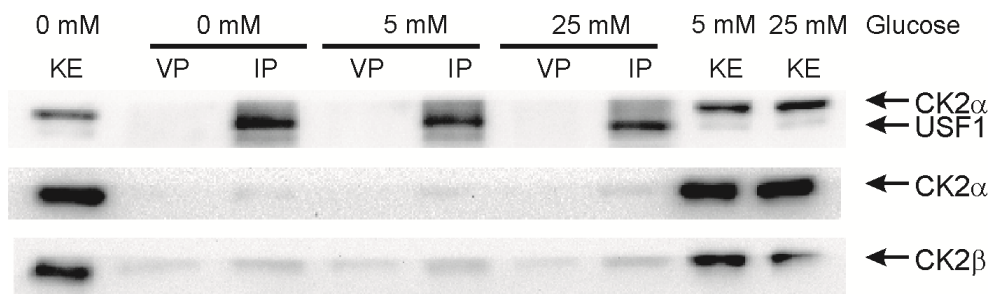


Abbildung 28: Coimmunpräzipitation von USF2-Interaktionspartnern aus INS-1-Zellkernextrakten nach vierstündiger Glucosebehandlung von INS-1-Zellen. INS-1-Zellen wurden über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Tag für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose inkubiert. Nach Herstellung von Zellkernextrakten wurden jeweils 2 mg Zellkernextrakt zusammen mit einem Gemisch aus Protein-G- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF2 (sc-862), 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (VP), sowie einer Zellkernextraktkontrolle (KE, 50 µg) in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Sichtbarmachung von copräzipitiertem USF1 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683, sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. Die Sichtbarmachung von copräzipitierter CK2 erfolgte für die CK2 α -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und für die CK2 β -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666), sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. VP: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, KE: Zellkernextrakt.

Da bisher bezüglich der subzellulären Lokalisation und Interaktion der USFs bzw. CK2 in Abhängigkeit von Glucose keine Effekte detektiert werden konnten, wurde nun ein möglicher Glucose-Einfluss auf die Transkriptionsfaktoraktivität der USF-Proteine untersucht, da bekannt ist, dass Glucose Genexpressionen beeinflussen kann [112, 126, 141, 172, 219, 228]. Zunächst wurde dabei die Glucose-abhängige Transaktivierung der Promotoren von PDX-1 und Insulin in INS-1-Zellen überprüft. Anschließend wurde der USF1-Effekt auf die Glucose-abhängige Transaktivierung der PDX-1- und Insulinpromotoraktivität herausgearbeitet. Im nächsten Schritt wurde dann der Zusammenhang von Glucose und CK2 auf die USF1-abhängige Transrepression des PDX-1 Promotors weiter analysiert.

Dazu wurden INS-1-Zellen zunächst auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukt (PDX-1: -6500-STF-luc oder Insulin: pGEM3ZFM-RIP1-POLYA) mithilfe des ViaFectTM Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze über Nacht gehungert und anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Nach diesen 4 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten des 0 mM Glucose-behandelten Ansatzes 100% gesetzt, die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet, und die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Reporteranalyse des PDX-1- und Insulinpromotors nach vierstündiger Glucosebehandlung. Wie man in den Abbildungsteilen a und b erkennen kann, lassen sich die Aktivitäten beider Promotoren durch Glucose steigern. Dabei zeigt sich zunächst ein Anstieg nach Behandlung mit Normoglucose, der dann beim PDX-1 Promotor noch weiter ansteigt, während er beim Insulinpromotor wieder ein Stück weit rückläufig wird, allerdings nie das Niveau der Promotoraktivitäten bei Glucosekarenz erreicht. Damit lässt sich eindeutig sagen, dass Glucose auch in INS-1-Zellen die Expression von PDX-1 und Insulin in einem Zeitrahmen von 4 Stunden positiv regulieren kann.

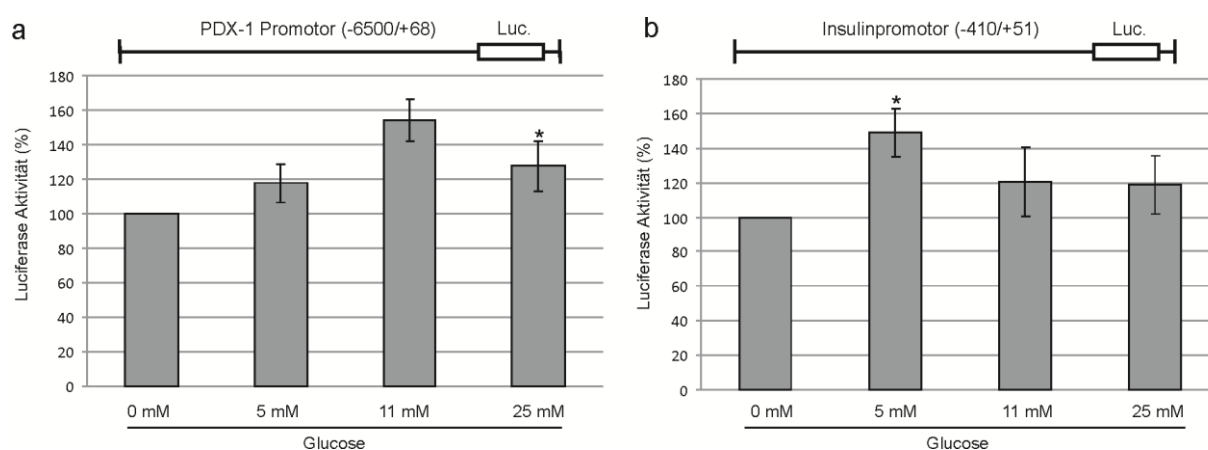


Abbildung 29: Glucose-Effekt auf die relative PDX-1- und Insulinpromotor Aktivität in INS-1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen für 4 Stunden. INS-1-Zellen wurden entweder (a) mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc oder (b) mit dem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pGEM3ZFM-RIP1-POLYA mithilfe des ViafectTM Kits transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen über Nacht gehungert und die Ansätze anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Nach dieser Zeit wurde die Luciferase-Aktivität nach

6. Ergebnisse

Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten der mit 0 mM Glucose behandelten Ansätze auf 100% gesetzt und die übrigen Ansätze darauf bezogen. Das Ergebnis ist jeweils als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf 0 mM Glucose bestimmt, wobei * signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.05$ ist.

Zur Analyse der Glucose-abhängigen Transkriptionsfaktoraktivität von USF1 auf die Promotoren von PDX-1 und Insulin, wurden INS-1-Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukt (PDX-1: -6500-STF-luc oder Insulin: pGEM3ZFM-RIP1-POLYA) und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des ViaFect™ Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze zunächst über Nacht gehungert und anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Nach diesen 4 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse wurde die Expression des transfizierten FLAG-USF1-Expressionsplasmids überprüft (monoklonaler Maus-Antikörper Anti-FLAG M2). Als Ladekontrolle wurde auch hier α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) nachgewiesen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten des USF1-transfizierten und mit 0 mM Glucose behandelten Ansatzes 100% gesetzt, die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet und die y-Achse zur besseren Ansicht der Effekte gebrochen dargestellt. In Abbildung 30 a ist das Ergebnis des Reporterassays für den PDX-1 Promotor dargestellt. Wie sich deutlich erkennen lässt, wird die Aktivität des PDX-1 Promotors nach Überexpression von USF1 unabhängig von der Glucosekonzentration stark gehemmt, wie in vorherigen Versuchen schon festzustellen war. Diese Hemmung scheint aber einen noch stärkeren Effekt bei 0 mM Glucose im Vergleich zu 5 mM, 11 mM und 25 mM Glucose zu haben. Die USF1-abhängige Repression nimmt demnach mit steigender Glucosekonzentration bis hin zu 11 mM leicht ab, während der Effekt bei 25 mM Glucose schon wieder leicht rückläufig ist. Die Expression von FLAG-USF1 und α -Tubulin wurde exemplarisch in Abbildung 30 c

überprüft. Für den Insulinpromotor zeigt sich nach Transfektion von USF1 und anschließender Glucosebehandlung ein ähnliches Aktivitätsbild wie für den PDX-1 Promotor (Abbildung 30 b). Auch der Insulinpromotor wird (wie in vorherigen Analysen bereits erläutert) durch USF1 reprimiert, wobei diese USF1-abhängige Repression auch mit steigender Glucosekonzentration leicht abnimmt. Die Expression von FLAG-USF1 und α -Tubulin wurde auch hier exemplarisch überprüft (Abbildung 30 d). Die Effekte von Glucose auf die Aktivität der beiden Promotoren von PDX-1 und Insulin decken sich damit auch mit den Effekten bezüglich der CK2-Aktivität. Auch dort ließen sich mit steigender Glucosekonzentration im Vergleich zu 0 mM Glucose steigende Kinaseaktivitäten verzeichnen, die bei 25 mM Glucose wieder leicht rückläufig waren. Somit gilt Glucose als Aktivator der PDX-1- und Insulingenexpression in INS-1-Zellen, wobei die USF1-abhängige Repression den Glucose-Effekt in seiner Stärke überwiegt.

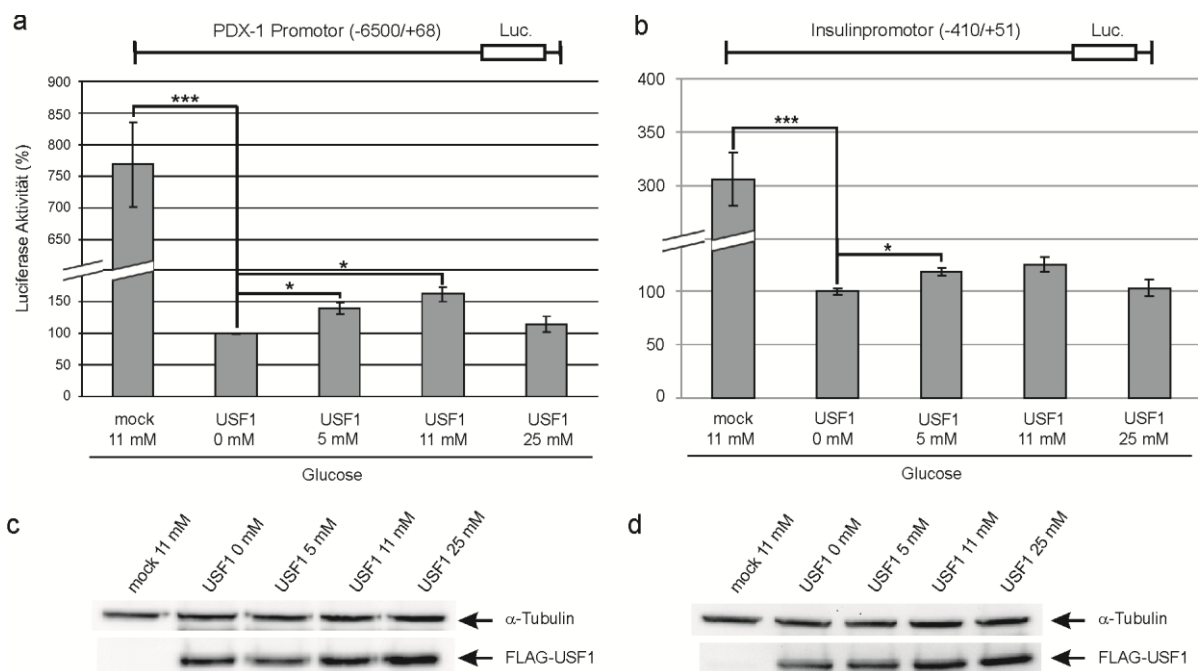


Abbildung 30: USF1-Effekt auf die relative PDX-1- und Insulinpromotor Aktivität in INS-1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen für 4 Stunden. INS-1-Zellen wurden entweder (a) mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 oder (b) mit dem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt pGEM3ZFM-RIP1-POLYA und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen über Nacht gehungert und die Ansätze anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Nach dieser Zeit wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten der USF1-transfizierten und mit 0 mM Glucose behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, die übrigen Ansätze darauf bezogen und die

6. Ergebnisse

y-Achse zur besseren Ansicht der Effekte gebrochen dargestellt. Das Ergebnis ist jeweils als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (c)+(d) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bzw. USF1 0 mM Glucose bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock bzw. USF1 0 mM Glucose mit $p < 0.05$, ** signifikant verschieden von mock bzw. USF1 0 mM Glucose mit $p < 0.01$ und *** signifikant verschieden von mock bzw. 0 mM Glucose mit $p < 0.001$ ist.

In einem weiteren Versuchsteil wurde nun der Effekt von Glucose und einer gleichzeitigen CK2-Hemmung auf die USF1-abhängige Repression des PDX-1 Promotors untersucht. Dazu wurden INS-1-Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem PDX-1 Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des ViaFectTM Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze zunächst über Nacht gehungert und anschließend für 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose und parallel für 4 Stunden entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M Quinalizarin (Q) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach diesen 4 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse wurde die Expression des transfizierten FLAG-USF1-Expressionsplasmids überprüft (monoklonaler Maus-Antikörper Anti-FLAG M2) und als Ladekontrolle auch hier α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) nachgewiesen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge und Menge an exprimiertem FLAG-USF1 pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten der mock transfizierten und mit 0 mM Glucose behandelten Ansätze 100% gesetzt, die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet und die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt. In Abbildung 31 a ist das Ergebnis des Reporterassays für den PDX-1 Promotor nach Glucosebehandlung und Hemmung mit CX-4945, in Abbildung 31 c das Ergebnis des Reporterassays für den PDX-1 Promotor nach Glucosebehandlung und Hemmung mit Quinalizarin (Q) dargestellt. Es zeigt sich zunächst, dass USF1 die PDX-1 Promotoraktivität unabhängig der Konzentration an Glucose oder CK2-Inhibitor nach wie vor hemmt. Dabei lässt sich diese Repression aber durch Glucose weiterhin in geringem Maße

6. Ergebnisse

abschwächen, wie sich auch in den vorherigen Versuchen schon nachweisen ließ. Diese Glucose-abhängige Abschwächung der PDX-1 Transrepression verändert sich aber nicht bei gleichzeitiger Behandlung mit CX-4945 oder Quinalizarin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Demnach scheint eine CK2-Hemmung die Transkription des PDX-1 Gens nicht additiv mit Glucose zu regulieren. Die Expression von FLAG-USF1 wurde auch hier überprüft und exemplarisch dargestellt (Abbildung 31 b+d).

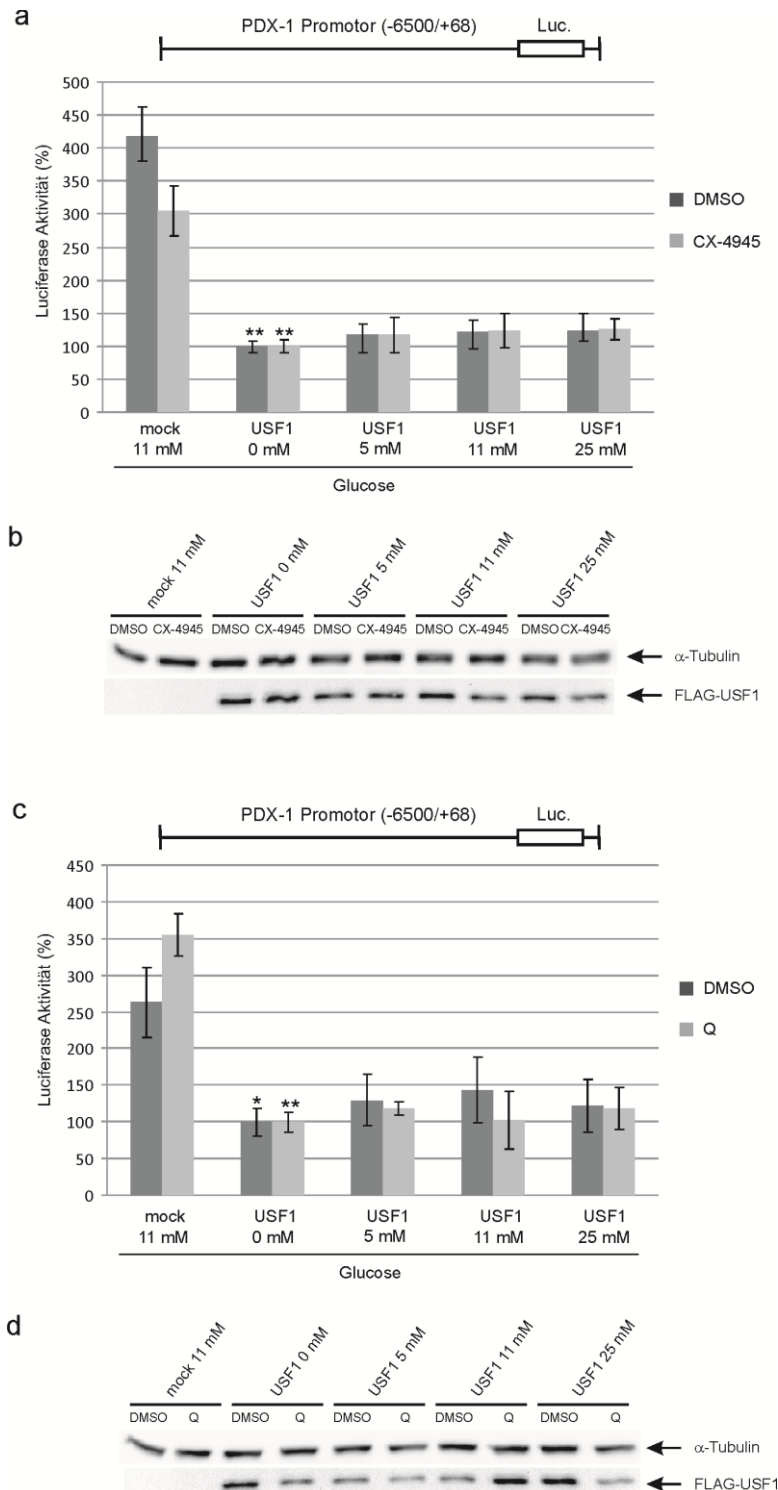


Abbildung 31: USF1-Effekt auf die relative PDX-1-Promotor Aktivität in INS-1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen und paralleler Hemmung der CK2-Aktivität für 4 Stunden. INS-1-Zellen wurden mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 mithilfe des ViafectTM Kits transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen über Nacht gehungert und die Ansätze anschließend für 4 Stunden entweder (a) mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose und 10 µM CX-4945 bzw. DMSO, oder (c) mit 0 mM, 5 mM, 11 mM oder 25 mM Glucose und 50 µM Quinalizarin bzw. DMSO behandelt. Nach dieser Zeit wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten der mock transfizierten und mit 0 mM Glucose behandelten Ansätze auf 100% gesetzt, und die übrigen Ansätze darauf bezogen. Das Ergebnis ist jeweils als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b)+(d) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (monoklonaler FLAG-Antikörper FLAG M2) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von mock mit $p < 0.01$ ist.

Zusammenfassend kann für diesen Teil der Arbeit angemerkt werden, dass die Glucosekonzentration in INS-1-Zellen die Funktionen sowohl der USF-Proteine, als auch von CK2 beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass zwar Expression und Lokalisation der untersuchten Proteine unabhängig von Glucose stattfinden, die CK2-Aktivität aber durch Glucose signifikant gesteigert werden kann. Während die Interaktion von USF1/USF2 und USF/CK2 nicht durch Glucose verändert wird, wird die Transrepression durch USF1 am PDX-1- und am Insulinpromotor durch Glucose abgeschwächt. Eine additive Abschwächung der USF1-abhängigen Transrepression des PDX-1 Promotors durch parallele Glucosebehandlung und CK2-Hemmung findet in den INS-1-Zellen nicht statt, wobei Glucose aber nach wie vor alleine schon die USF1-abhängige Transrepression der PDX-1 Promotoraktivität abschwächt. Da PDX-1 ein Schlüsselprotein bei der Pankreasentwicklung darstellt und essentiell für die Funktionalität der β -Zellen ist [12], war es weiterführend interessant, die Funktionen der USF-Proteine in Abhängigkeit von Glucose und CK2 am PDX-1 Promotor in INS-1-Zellen näher zu untersuchen, und damit auch weitere Schlüsse auf die Regulation der Transkription des Insulins zu ziehen.

6.5 Analyse der Funktionen der USF-Proteine am PDX-1 Promotor in Abhängigkeit von Glucose bzw. CK2-Phosphorylierung in INS-1-Zellen

Zur Modulation von Genexpressionen und für die Ausübung ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren, müssen USF1 und USF2 an die sogenannten E-Box Motive innerhalb eines Promotors binden, was sie dann (zumeist im Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren) dazu befähigt, die Expression des jeweiligen Gens positiv oder negativ zu beeinflussen [43]. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die USF-Proteine an ein E-Box Motiv im proximalen Bereich des PDX-1 Promotors an Stelle -107 bis -102 binden [260]. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde deshalb ein kurzer Biotin-markierter DNA-Abschnitt, eine sogenannte PDX-1 DNA Sonde, von -221 bis +22 des PDX-1 Promotors amplifiziert, der dieses E-Box Motiv enthält, und für DNA-Bindungsanalysen der USF-Proteine am PDX-1 Promotor in INS-1-Zellen verwendet werden kann. Desweiteren ist eine Autoregulation von PDX-1 [168, 180] an seinem eigenen Promotor bekannt, weshalb zusätzlich eine Bindung von PDX-1 zusammen mit den USF-Proteinen am E-Box Motiv des proximalen PDX-1 Promotors untersucht wurde.

Zur Herstellung der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) wurde eine komparative PCR mit den entsprechenden Primern und dem Ratten PDX-1 Promotor durchgeführt und der Erfolg der PCR anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Als Kontrolle für zelluläre Analysen wurde die Sonde zusätzlich mittels Punktmutation so verändert, dass das E-Box Motiv als Erkennungssequenz für die USFs mutiert ist, und die Sonde somit als Negativkontrolle für eine spezifische USF-Bindung am PDX-1 Promotor fungieren konnte (PDX-1mut). Zur Überprüfung einer Bindung von USF1, USF2 und PDX-1 bzw. CK2 an diese DNA Sonden wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt und nach Zugabe von Lachssperma-DNA die Biotin-markierte PDX-1 DNA Sonde für 30 Minuten über Kopf taumelnd bei 4°C dazugegeben. Anschließend wurden 50 µl µMACS Streptavidin™ MicroBeads pro µg DNA Sonde zur Probe pipettiert und der komplette Ansatz auf eine µ-Säule gegeben. Zur Entfernung nicht an die µ-Säule gebundener Proteine und DNA, wurde die µ-Säule anschließend gewaschen, bevor eine fünfminütige Inkubation mit 95°C-heißem 1x SDS-Probenpuffer folgte. Nach Zugabe weiterer 50 µl 1x SDS-Probenpuffer wurden die an die DNA gebundenen Proteine eluiert, auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und per Western Blot analysiert. Hierbei wurde zum Nachweis der USF-Proteine aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichtes bei allen pull-down Analysen stets ein separates Experiment durchgeführt. Desweiteren wurde zum Nachweis von USF1, USF2 und PDX-1 jeweils immer 1 mg INS-1-Zellkernextrakt verwendet, wohingegen zur Sichtbarmachung der CK2-

Untereinheiten 2 mg Zellkernextrakt im DNA pull-down Assay eingesetzt wurden. Das Ergebnis des DNA pull-downs ist in Abbildung 32 dargestellt. Wie sich in den Abbildungsteilen a und b erkennen lässt, zeigt sich sowohl für USF1, als auch für USF2 eine starke Bindung an die PDX-1 DNA Sonde. Nach Mutation des E-Box Motivs an Stelle -107 bis -102, binden weder USF1, noch USF2 an diesen DNA-Abschnitt. Desweiteren zeigt sich in Abbildungsteil c, dass auch PDX-1 an die PDX-1 Sonde bindet, aber diese Bindung nach Mutation der E-Box nicht verloren geht, was darauf hindeutet, dass PDX-1 nicht nur über die USF-Proteine an seinen eigenen Promotor bindet. In Abbildungsteil 32 d wurde noch überprüft, ob diese Protein-DNA-Interaktion zusammen mit CK2 erfolgt, oder ob sich die USF/CK2-Interaktion vor oder nach der Bindung der USFs an den PDX-1 Promotor ereignet. Wie sich gut erkennen lässt, bindet keine der CK2-Untereinheiten an die PDX-1 DNA Sonde. Demnach scheint die USF1-Phosphorylierung durch die CK2, und die damit verbundene Enzym-Substrat-Interaktion, ein prä- oder post-DNA-Bindungseffekt zu sein.

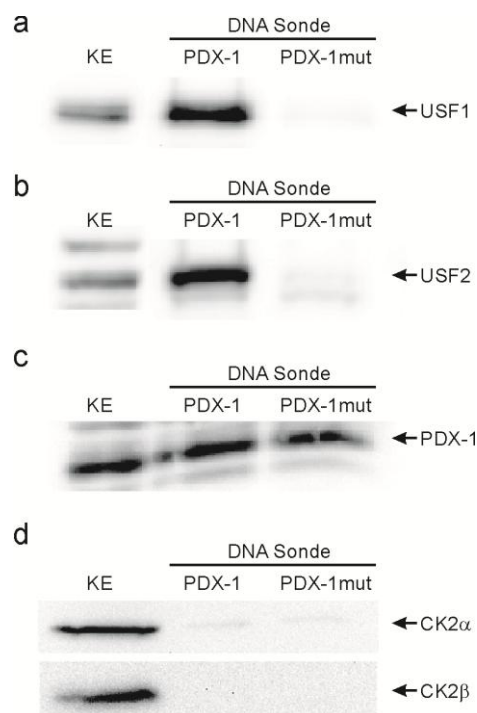


Abbildung 32: Western Blot Analyse des DNA pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor. Aus INS-1-Zellen wurden Zellkernextrakte hergestellt und (a-c) 1 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads zur Detektion der USF-Proteine bzw. (d) 2 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 100 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads zur Detektion der CK2-Untereinheiten auf eine μ -Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, zusammen mit einer Zellkernextraktkontrolle (KE, 50 μ g) in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die immunologische Sichtbarmachung der eluierten Proteine erfolgte in (a) für USF1 mit dem polyklonalen

Kaninchen-Antikörper sc-229, in (b) für USF2 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 und in (c) für PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. (d) Die immunologische Sichtbarmachung von CK2 erfolgte für die CK2 α -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und für die CK2 β -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper E-9 (sc-46666), sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System.

Nachdem geklärt war, dass die Proteinkinase CK2 nicht zusammen mit USF1 und USF2, oder PDX-1, an den PDX-1 Promotor bindet, wurde nun untersucht, ob die CK2 möglicherweise das Bindungsverhalten der USFs oder von PDX-1 an die PDX-1 DNA Sonde beeinflusst. Da in der vorliegenden Arbeit in INS-1-Zellen bereits herausgearbeitet wurde, dass eine USF1-Phosphorylierung durch die CK2 die Interaktion beider USFs miteinander negativ beeinflusst, wurde deshalb analysiert, ob dies auch für die DNA-Bindungsfähigkeit an den PDX-1 Promotor der Fall ist. Dazu wurden INS-1-Zellen für 24 Stunden entweder mit 10 μ M CX-4945, 50 μ M Quinalizarin (Q) oder 50 μ M TBB bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach diesem Zeitpunkt wurden Zellkernextrakte hergestellt und der DNA pull-down Assay analog Punkt 5.3.18 durchgeführt. Das Ergebnis des pull-down Assays nach Hemmung mit verschiedenen CK2-Inhibitoren ist in Abbildung 33 dargestellt. Wie sich im Abbildungsteil a und b erkennen lässt, binden USF1 und PDX-1 sowohl im DMSO behandelten, als auch in den mit CK2-Hemmstoff behandelten Ansätzen an den PDX-1 Promotor. Die genaue Quantifizierung der Mengen an gebundenem USF1 und PDX-1 an der PDX-1 DNA Sonde zeigt, dass einerseits die USF1-Bindung nach Hemmung der CK2 schwächer stattfindet, während andererseits die Bindung von PDX-1 am Promotor weitestgehend unbeeinflusst einer CK2-Hemmung bleibt (Abbildungsteil c). Diese Resultate lassen sich auch übereinstimmend für alle CK2-Inhibitoren feststellen. Das Ergebnis deutet also darauf hin, dass ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes USF1 schlechter an den PDX-1 Promotor bindet. Die CK2-Phosphorylierung übt somit einen positiven Einfluss auf die DNA-Bindung von USF1 an diesem Promotor aus, während eine Bindung von PDX-1 an seinen eigenen Promotor im proximalen Bereich ungeachtet einer Phosphorylierung durch die CK2 stattfindet.

6. Ergebnisse

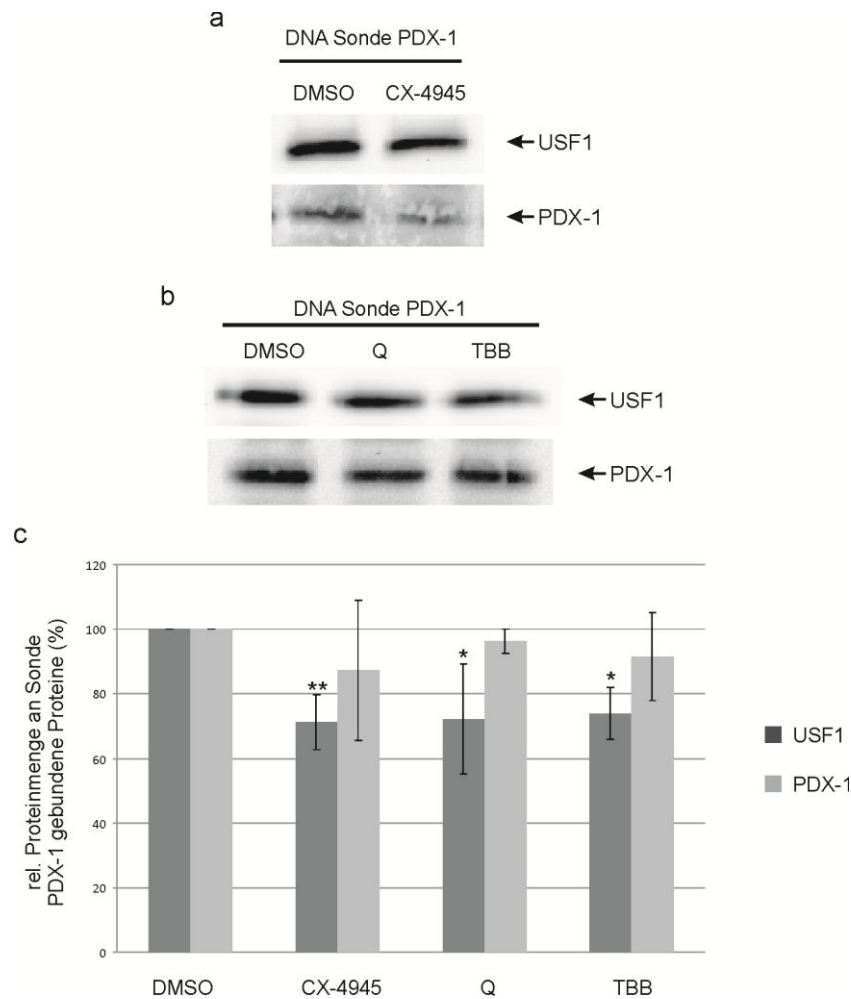


Abbildung 33: Western Blot Analyse des DNA pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor nach CK2-Hemmung. INS-1-Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen CK2-Inhibitoren bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 1 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads auf eine μ -Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, in einem 10%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. (a) INS-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und nach Western Blot Analyse USF1 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683 und PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 detektiert. (b) INS-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 50 μ M Quinalizarin oder 50 μ M TBB bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und nach Western Blot Analyse USF1 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683, und PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 detektiert. (c) Die Proteinmengen des an die PDX-1 DNA Sonde gebundenen USF1 und PDX-1 nach Behandlung mit verschiedenen CK2-Hemmstoffen aus 3 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, und in einem Balkendiagramm bezogen auf die DMSO-Kontrolle prozentual dargestellt. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf DMSO bestimmt, wobei * signifikant verschieden von DMSO mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von DMSO mit $p < 0.01$ ist.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass sich das DNA-Bindungsverhalten von USF1 an den PDX-1 Promotor nach Behandlung mit verschiedenen CK2-Hemmstoffen verschlechtert, während die PDX-1-Bindung am PDX-1 Promotor unverändert bleibt, wurden diese Effekte durch Transfektion einer USF1-Phosphorylierungsmutante, deren CK2-Phosphorylierungsstelle Threonin 100 durch ein nicht-phosphorylierbares Alanin ausgetauscht wurde, überprüft. Dazu wurden INS-1-Zellen mit dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 oder dem mutierten USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1_{T100A}-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt, der pull-down Assay wie im vorherigen Experiment durchgeführt, und an die PDX-1 DNA Sonde gebundene FLAG-Proteine und gebundenes PDX-1 detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigt sich in Abbildungsteil a, dass ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes USF1 schlechter an den PDX-1 Promotor bindet, während die PDX-1 Bindung an der PDX-1 DNA Sonde nur minimal schwächer wird. Die Quantifizierung dieser Daten (Abbildung 34 b) bestärkt die vorherigen Ergebnisse zur CK2-abhängigen Bindung von USF1 am PDX-1 Promotor noch zusätzlich in der Form, dass hier der direkte Effekt der CK2 auf die Phosphorylierung an Threonin 100 analysiert wurde und Seiteneffekte, wie sie durch Behandlung mit Hemmstoffen entstehen können, ausgeschlossen wurden.

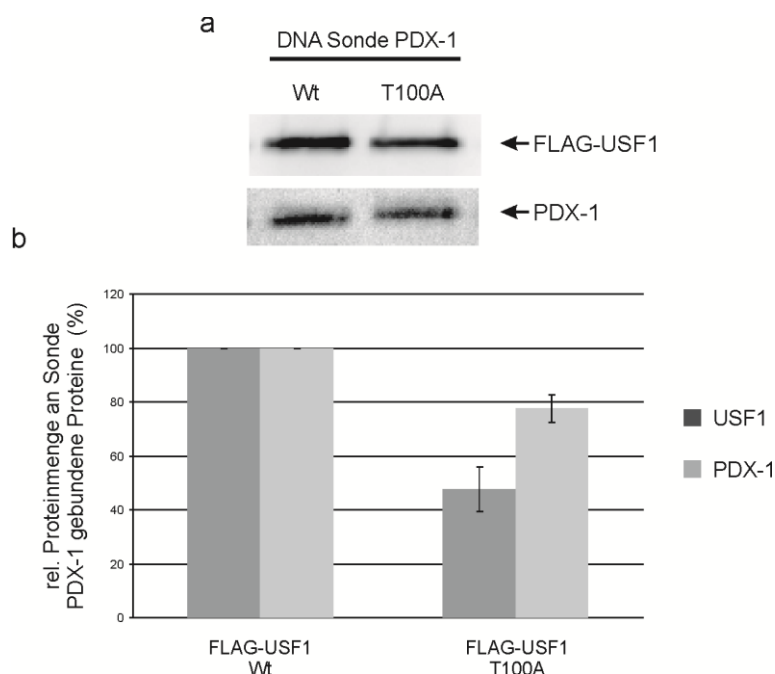


Abbildung 34: Western Blot Analyse des pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor nach Transfektion von FLAG-USF1 Wt bzw. der USF1-Phosphorylierungsmutante FLAG-USF1_{T100A}. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 oder dem mutierten USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1_{T100A}-Myc-CMV24 mithilfe des Turbofect® Kits transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 1 mg Zellkernextrakt zusammen

6. Ergebnisse

mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 µl µMACS StreptavidinTM MicroBeads auf eine µ-Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die µ-Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, in einem 10%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse zur Detektion der FLAG-Proteine mit dem monoklonalen FLAG-Antikörper FLAG M2, und zur Detektion von PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 unterzogen. (b) Die Proteinmengen der transfizierten FLAG-Proteine und von PDX-1, welche an die PDX-1 DNA Sonde gebunden haben, aus 3 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, und in einem Balkendiagramm bezogen auf die Menge gebundener Proteine im FLAG-USF1-Wt transfizierten Ansatz prozentual dargestellt.

Nach den erhaltenen Daten der DNA-Bindungsanalysen der USFs in Abhängigkeit einer CK2-Phosphorylierung am PDX-1 Promotor, wurde der Effekt von Glucose auf das Bindungsverhalten der USFs am PDX-1 Promotor untersucht. Da in bisherigen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass nach Überexpression von USF1 bei 0 mM Glucose eine noch stärkere Repression der PDX-1 Promotoraktivität zu messen ist, war es nun interessant zu analysieren, ob dies aus einem unterschiedlichen Bindungsverhalten der USFs an den PDX-1 Promotor in Abhängigkeit der Glucosekonzentration resultiert. Dazu wurden INS-1-Zellen über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Tag 4 Stunden entweder mit 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Nach diesem Zeitpunkt wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt und der DNA pull-down Assay analog Punkt 5.3.18 durchgeführt. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 35 dargestellt. Wie in Abbildungsteil a zu erkennen ist, findet eine viel stärkere Bindung von USF1, und auch von USF2, an den PDX-1 Promotor bei 0 mM Glucosebedingungen statt. Die relative USF1- und USF2-Proteinmenge nimmt von 5 mM bis hin zu 25 mM Glucose stetig ab (Abbildungsteil b). Vergleicht man dazu die Bindung von PDX-1 an der PDX-1 DNA Sonde, zeigt sich hier hingegen, dass diese bei allen Glucosekonzentrationen nahezu unverändert stattfindet (Abbildung 35 a und b). Lediglich bei einer Konzentration von 25 mM Glucose ist eine leichte Reduktion in der PDX-1 Bindung am E-Box Motiv zu verzeichnen, was mit der insgesamt stark verminderten USF-Menge an der DNA Sonde zusammenhängen könnte, über die PDX-1 vermutlich am E-Box Motiv bindet. Somit kann geschlussfolgert werden, dass der USF1/USF2-Komplex unter Glucosekarenz stärker an den PDX-1 Promotor bindet, während PDX-1 dies unabhängig von der Glucosekonzentration gleichermaßen stark tut.

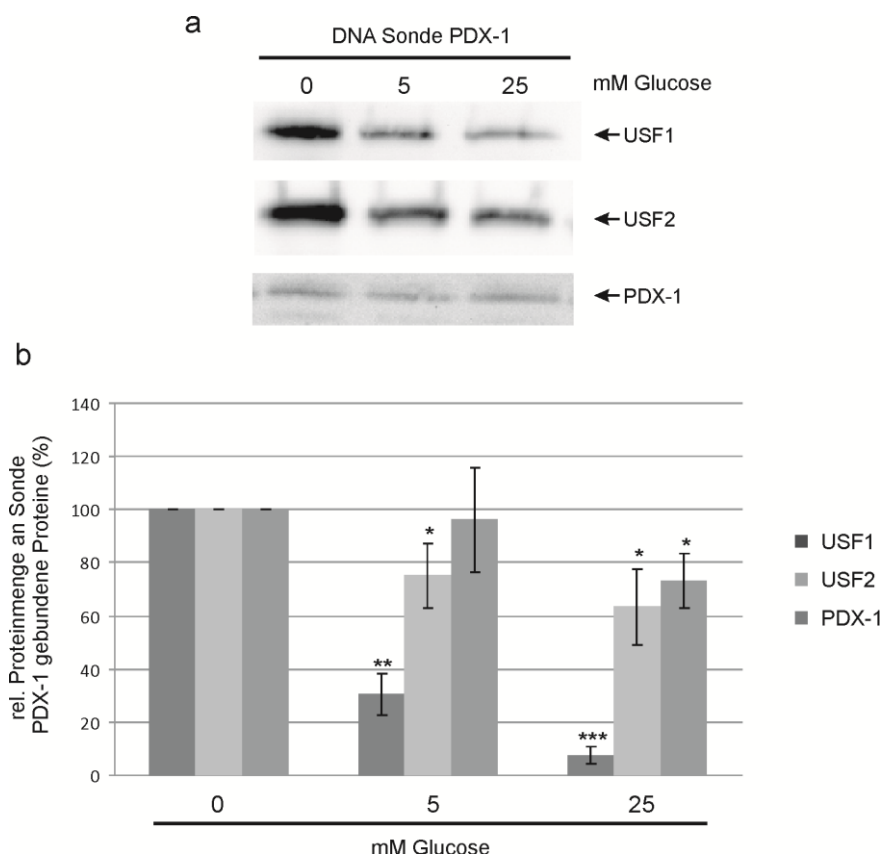


Abbildung 35: Western Blot Analyse des DNA pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor nach Behandlung von INS-1-Zellen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen für 4 Stunden. INS-1-Zellen wurden über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Tag 4 Stunden mit 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose behandelt. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 1 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads auf eine μ -Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, in einem 12.5%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. (a) Die immunologische Sichtbarmachung von USF1 erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683, für USF2 mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-862 und für PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, sowie nachfolgender Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. (b) Die Proteinmengen des an die PDX-1 DNA Sonde gebundenen USF1, USF2 und PDX-1 nach Behandlung von INS-1-Zellen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen aus 3 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, und in einem Balkendiagramm bezogen auf den 0 mM Glucosewert prozentual dargestellt. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf 0 mM Glucose bestimmt, wobei * signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.05$, ** signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.01$ und *** signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $p < 0.001$ ist.

Da sich in den vorherigen Analysen sowohl ein Effekt von Glucose, als auch von CK2 auf das DNA-Bindungsverhalten der USF-Proteine am PDX-1 Promotor gezeigt hat, wurde deshalb untersucht, ob diese beiden Wirkungen synergistisch oder additiv stattfinden. Die starken

Effekte unter Glucosekarenz auf die Bindungsfähigkeit der USFs sollte deshalb im Vergleich zu Normoglucose (5 mM) bei paralleler Behandlung mit einem CK2-Inhibitor bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle überprüft werden. Dazu wurden INS-1-Zellen über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Morgen parallel für 4 Stunden entweder mit 0 mM Glucose und 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle, oder mit 5 mM Glucose und 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach diesem Zeitpunkt wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt und erneut ein pull-down Assay mit dem PDX-1 Promotor durchgeführt, der in Abbildung 36 dargestellt ist. In Abbildungsteil a zeigt sich, dass USF1 unter allen Bedingungen an den PDX-1 Promotor bindet, wobei diese Bindung allerdings im Bezug auf die verschiedenen Stimuli variiert. Zum einen lässt sich in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten nachweisen, dass die Bindung von USF1 an die DNA Sonde bei 0 mM Glucose stärker ist als in Anwesenheit von Glucose. Zum anderen ist diese Bindung bei 0 mM Glucose nach CK2-Hemmung mit CX-4945 schwächer als in der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Bei 5 mM Glucose lassen sich keine Unterschiede in der USF1-Bindungsstärke in Abhängigkeit einer CK2-Hemmung detektieren. Wertet man die Proteinmengen an gebundenem USF1 an der PDX-1 DNA Sonde nach Glucosebehandlung und CK2-Hemmung von mehreren Experimenten aus (Abbildung 36 b), scheint es so, dass sich der CK2-Einfluss auf das Bindungsverhalten von USF1 am PDX-1 Promotor nur bei 0 mM Glucose zeigt, während die CK2 bei 5 mM Glucose, also unter Normoglucosebedingungen, das Bindungsverhalten von USF1 an den PDX-1 Promotor nicht verändert.

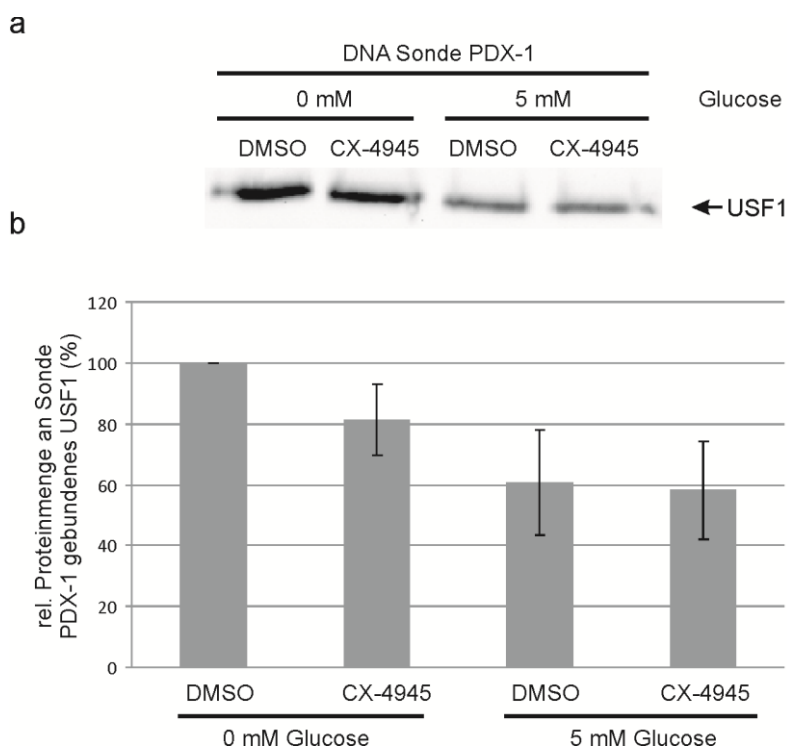


Abbildung 36: Western Blot Analyse des DNA pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor nach paralleler Behandlung von INS-1-Zellen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen und dem CK2-Hemmstoff CX-4945 für 4 Stunden. (a) INS-1-Zellen wurden über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Morgen für 4 Stunden entweder parallel mit 0 mM Glucose und 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle, oder parallel mit 5 mM Glucose und 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 1 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads auf eine μ -Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, in einem 10%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683 unterzogen. Die Proteinmengen des an die PDX-1 DNA Sonde gebundenen USF1 nach Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen und gleichzeitiger Behandlung mit dem CK2-Hemmstoff CX-4945 aus 3 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, und in einem Balkendiagramm bezogen auf die 0 mM DMSO-Kontrolle prozentual dargestellt.

Um die erhaltenen Ergebnisse des pull-down Assays von USF1 am PDX-1 Promotor in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und einer gleichzeitigen CK2-Hemmung weiter zu unterstützen, wurde der Versuch bei der Glucosekonzentration von 0 mM noch zusätzlich zur parallelen Hemmung mit CX-4945 parallel mit 0 mM Glucose und dem CK2-Inhibitor Quinalizarin (Q) wiederholt. Dazu wurden INS-1-Zellen über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Morgen für 4 Stunden parallel mit 0 mM Glucose und 10 μ M CX-4945, oder parallel mit 0 mM Glucose und 50 μ M Quinalizarin (Q) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach diesem Zeitpunkt wurden INS-1-Zellkernextrakte hergestellt und der pull-down Assay analog zu den vorherigen Experimenten mit dem PDX-1 Promotor durchgeführt (Abbildung 37). In Abbildungsteil a zeigt sich, dass USF1 erneut unter allen Bedingungen an den PDX-1 Promotor bindet, diese Bindung aber, ähnlich wie auch im vorherigen Experiment, in Abwesenheit von Glucose und gleichzeitiger CK2-Hemmung abnimmt. Dies lässt sich auch nach Behandlung mit Quinalizarin feststellen. Wertet man die Proteinmengen an gebundenem USF1 an der PDX-1 DNA Sonde unter Glucosekarenz und gleichzeitiger CK2-Hemmung von mehreren Experimenten auch hier aus (Abbildung 37 b), bestätigt sich die Vermutung, dass sich ein CK2-Einfluss auf das Bindungsverhalten von USF1 an den PDX-1 Promotor bei 0 mM Glucosestimulation bemerkbar macht, und die CK2 so verstärkt unter Glucosekarenz an der USF1-abhängigen Regulation des PDX-1 Promotors beteiligt zu sein scheint.

6. Ergebnisse

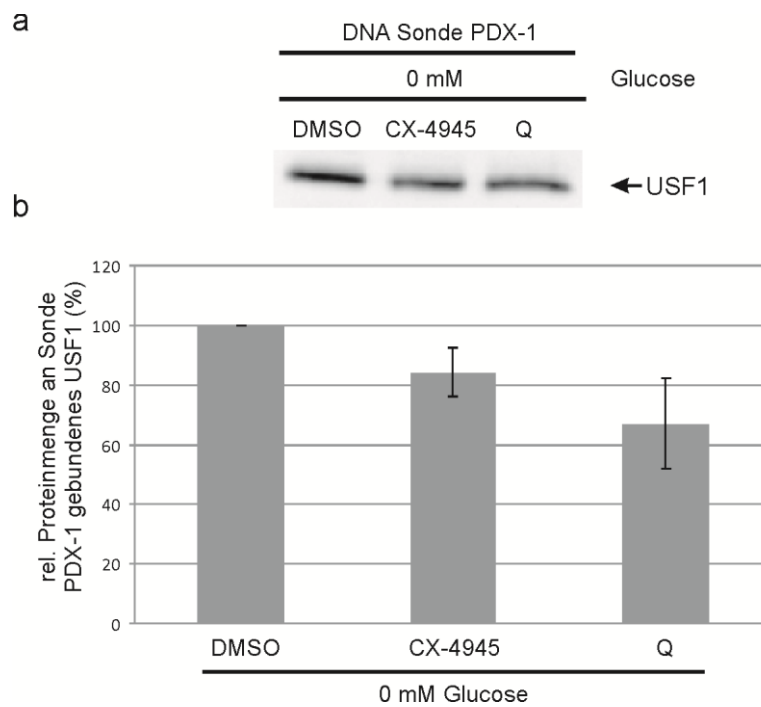


Abbildung 37: Western Blot Analyse des DNA pull-down Assays mit INS-1-Zellkernextrakten und dem PDX-1 Promotor nach paralleler Behandlung von INS-1-Zellen mit 0 mM Glucose und verschiedenen CK2-Hemmstoffen für 4 Stunden. (a) INS-1-Zellen wurden über Nacht unter Glucosekarenz gehalten und am nächsten Morgen für 4 Stunden parallel mit 0 mM Glucose und 10 μ M CX-4945, oder parallel mit 0 mM Glucose und 50 μ M Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils 1 mg Zellkernextrakt zusammen mit der PDX-1 DNA Sonde (PDX-1) und 50 μ l μ MACS StreptavidinTM MicroBeads auf eine μ -Säule geladen. Nach Abwaschen nicht an die μ -Säule gebundener Proteine und DNA, wurden die gebundenen DNA/Protein-Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert, in einem 10%igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-8683 unterzogen. Die Proteinmengen des an die PDX-1 DNA Sonde gebundenen USF1 nach Behandlung mit verschiedenen CK2-Hemmstoffen unter Glucosekarenz aus 3 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, und in einem Balkendiagramm bezogen auf die 0 mM DMSO-Kontrolle prozentual dargestellt.

Die bisher erhaltenen Erkenntnisse der pull-down Analysen mit dem PDX-1 Promotor widersprechen allerdings bekannter Literaturdaten, in denen Qian *et al.* postulierten, dass die USF-Proteine als Transaktivatoren der PDX-1 Genexpression fungieren [224]. Diese konnten durch Überexpression einer dominant-negativen USF-Mutante, die zwar mit den endogenen USF-Proteinen dimerisieren kann, aber unfähig ist, an DNA zu binden, zeigen, dass die endogene PDX-1 mRNA- und Proteinmenge dadurch in INS-1-Zellen sinkt [224]. In der vorliegenden Arbeit wurde USF1 überexprimiert und liegt so im Überschuss in den Zellen vor. Es stellte sich die Frage, ob USF1 der direkte Akteur der Transrepression am PDX-1 Promotor ist, oder ob die Überexpression von USF1 das Verhältnis der USFs und anderer Transkriptionsfaktoren, die bei der PDX-1 Genexpression ebenfalls eine Rolle spielen,

verändert, und so die PDX-1 Promotoraktivität variiert wird. Wie bereits vorab erwähnt, ist zum einen bekannt, dass PDX-1 seinen Maus-Promotor selbst regulieren kann [180], und zum anderen in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass PDX-1 zusammen mit den USF-Proteinen auch an seinen Ratten-Promotor bindet. Deshalb wurde weiterführend untersucht, ob das Wechselspiel dieser beiden Transkriptionsfaktoren essentiell für die Aktivität des PDX-1 Promotors in INS-1-Zellen ist. Dazu wurden die Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem PDX-1 Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. mit unterschiedlichen Mengen an USF1-Expressionsplasmid p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 oder an PDX-1 Expressionsplasmid p3xFLAG/CMV-7.1-PDX-1 WT mithilfe des ViaFectTM Kits transfiziert. Nach 48 Stunden wurde mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität im Doppelansatz ermittelt. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse wurden die Expressionen der transfizierten Proteine überprüft. USF1 wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen USF1 (sc-8683) überprüft, und die Expression des transfizierten PDX-1 mittels des Kaninchen-Antiserums gegen PDX-1 nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde jeweils α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) detektiert. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge pro Ansatz normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Desweiteren wurden die Luciferase Aktivitäten des mock transfizierten Ansatzes 100% gesetzt, die Aktivitäten der übrigen Ansätze relativ dazu berechnet und als Diagramm dargestellt. Hierbei wurden zwei getrennte Diagramme in Abbildung 38 und 39 angefertigt, um die Effekte der USF1- und der PDX-1-abhängigen Transfektion besser aufzeigen zu können. In Abbildung 38 a ist der Effekt der USF1-Überexpression in Abhängigkeit von der Menge an co-transfiziertem PDX-1 dargestellt. Wie man im letzten Balken des Diagramms erkennen kann, wird der PDX-1 Promotor nach alleiniger Überexpression von USF1 nach wie vor stark gehemmt. Minimiert man die Menge an transfiziertem USF1 bei gleichzeitiger Zugabe steigender Mengen von PDX-1, lässt sich deutlich erkennen, dass diese Repression immer schwächer wird, bis die Promotoraktivität bei gleichen Mengen an USF1 und PDX-1 dem mock transfizierten Ansatz gleicht. Da beide Proteine ein annähernd ähnliches Molekulargewicht besitzen, mussten die Ansätze zur Überprüfung der Transfektion in zwei getrennten Gelen aufgetrennt und

6. Ergebnisse

immunologisch jeweils mit den entsprechenden Antikörpern detektiert werden (Abbildungsteil b).

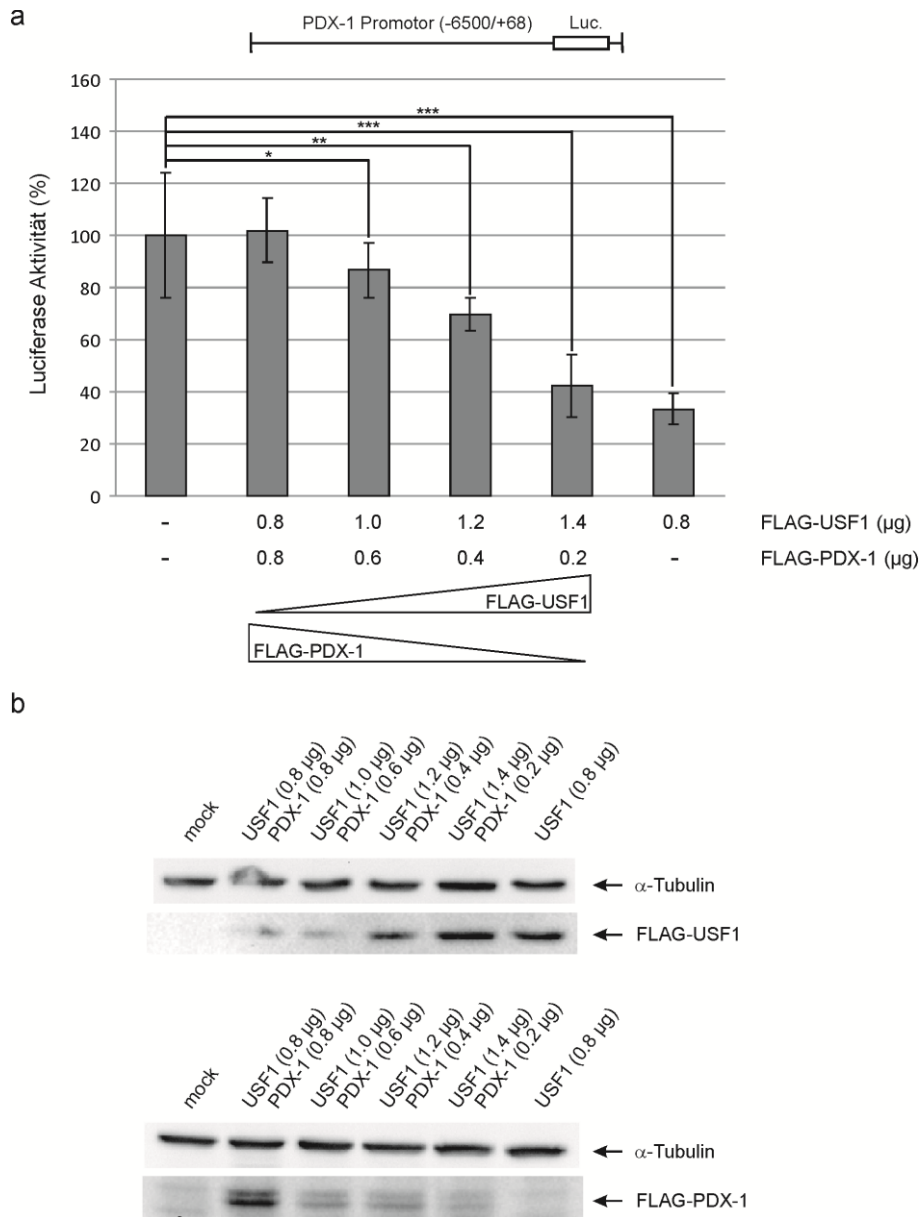


Abbildung 38: USF1- und PDX-1-Effekt auf die relative PDX-1 Promotor Aktivität in INS-1-Zellen nach Transfektion steigender Mengen an USF1 und abnehmender Mengen an PDX-1. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. unterschiedlicher Mengen (0.2 μg - 1.4 μg) des USF1-Expressionsplasmids p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 und unterschiedlicher Mengen (0.8 μg - 0.2 μg) des PDX-1 Expressionsplasmids p3xFLAG/CMV-7.1-PDX-1 WT mithilfe des ViaFect® Kits transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten des mock transfizierten Ansatzes auf 100% gesetzt und die übrigen Ansätze relativ dazu berechnet. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm zur Darstellung der USF1-abhängigen Effekte auf die PDX-1 Promotoraktivität mit den Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von

transfiziertem FLAG-USF1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-8683) und transfiziertem FLAG-PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) wegen des ähnlichen Molekulargewichtes beider Proteine in zwei getrennten Blots überprüft. α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) diente bei jeder Western Blot Analyse als Ladekontrolle. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock mit $p < 0.05$, ** signifikant verschieden von mock mit $p < 0.01$ und *** signifikant verschieden von mock mit $p < 0.001$ ist.

In Abbildung 39 ist der Effekt der PDX-1-Überexpression in Abhängigkeit der Menge an co-transfiziertem USF1 dargestellt. Es zeigt sich im letzten Balken des Diagrammes in Abbildungsteil a, dass die in der Literatur beschriebene Transaktivierung des PDX-1 Promotors durch PDX-1 auch in dem hier verwendeten Zellsystem reproduzierbar ist. Erhöht man die Mengen an PDX-1 und co-transfiziert gleichzeitig abnehmende Mengen an USF1, lässt sich deutlich erkennen, dass die PDX-1 abhängige Transaktivierung des PDX-1 Promotors immer stärker wird, wohingegen die Promotoraktivität, wie schon in Abbildung 38 gezeigt, bei gleichen Mengen an transfiziertem USF1 und PDX-1 auf das Niveau des mock transfizierten Ansatzes fällt. Im Abbildungsteil b sind, wie im Diagramm vorher, die Expression der transfizierten FLAG-Proteine USF1 und PDX-1 exemplarisch dargestellt, um die Konzentrationsgradienten der unterschiedlich transfizierten Plasmidmengen zu überprüfen. Da beide Proteine ein annähernd ähnliches Molekulargewicht besitzen, mussten die Ansätze auch hier in zwei getrennten Gelen aufgetrennt und immunologisch mit den entsprechenden Antikörpern detektiert werden. Nach den hier erhaltenen Reporteranalysen am PDX-1 Promotor nach Co-Transfektion von USF1 und PDX-1 kann geschlussfolgert werden, dass die USF1-abhängige Repression nicht aus einem direkten Effekt von USF1 am Promotor resultiert, sondern dass durch die Überexpression von USF1 das Angebot an aktivierenden Transkriptionsfaktoren am PDX-1 Promotor, wie zum Beispiel von PDX-1 selbst, verringert wird. USF1 scheint zwar einen reprimierenden Effekt auf den PDX-1 Promotor zu haben, welcher aber erst zum Tragen kommt, wenn das Angebot an transaktivierendem PDX-1 am PDX-1 Promotor kleiner ist.

6. Ergebnisse

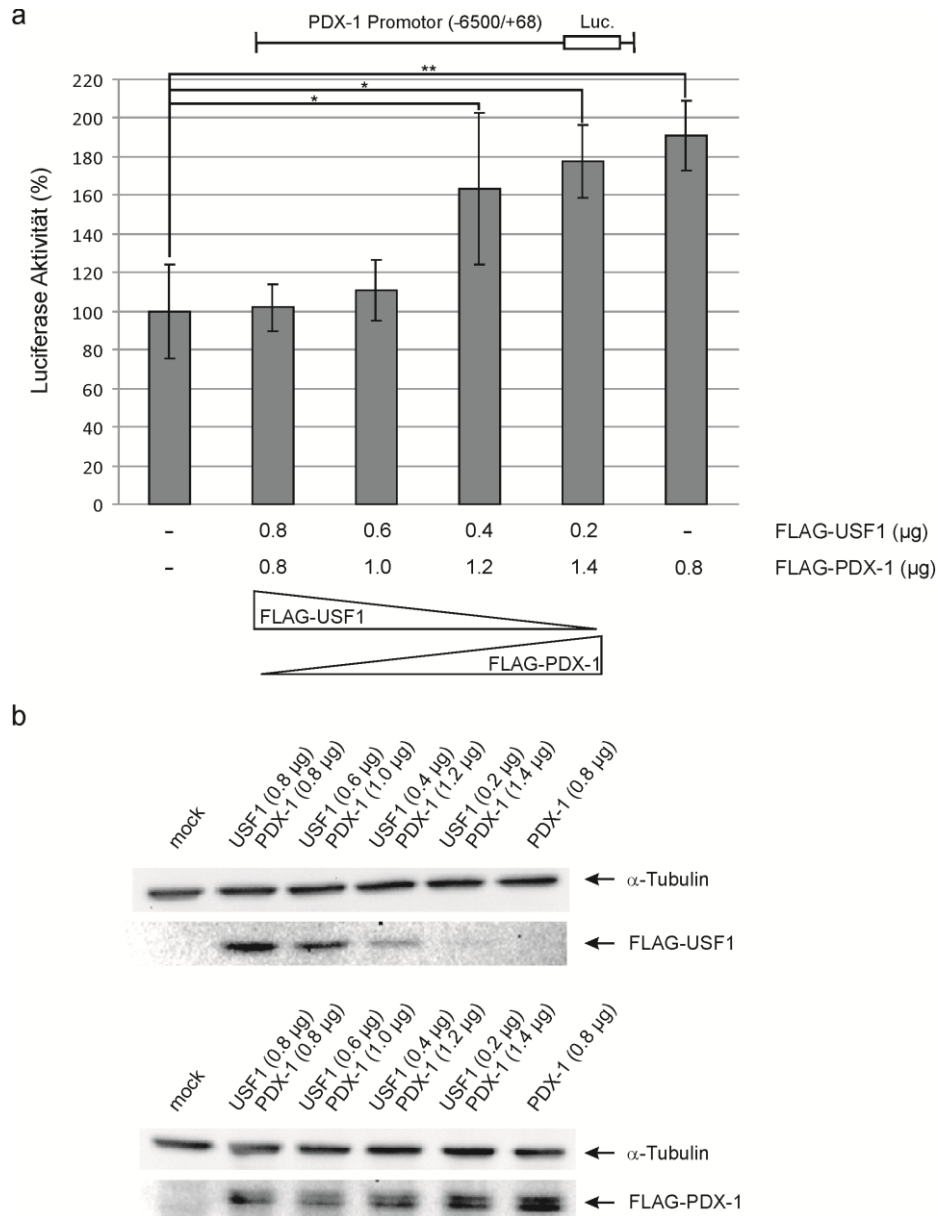


Abbildung 39: USF1- und PDX-1-Effekt auf die relative PDX-1 Promotor Aktivität in INS-1-Zellen nach Transfektion steigender Mengen an PDX-1 und abnehmender Mengen an USF1. (a) INS-1-Zellen wurden mit dem PDX-1 Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt -6500-STF-luc und dem Leerplasmid mock p3xFLAG-Myc-CMV24 bzw. unterschiedlicher Mengen (0.8 μg - 0.2 μg) des USF1-Expressionsplasmids p3xFLAG-USF1-Myc-CMV24 oder unterschiedlicher Mengen (0.8 μg - 1.4 μg) des PDX-1 Expressionsplasmids p3xFLAG/CMV-7.1-PDX-1 WT mithilfe des ViaFect® Kits transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die erzielten Luciferase Aktivitäten des mock transfizierten Ansatzes auf 100% gesetzt und die übrigen Ansätze relativ dazu berechnet. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm zur Darstellung der PDX-1-abhängigen Effekte auf die PDX-1 Promotoraktivität mit den Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (b) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von transfiziertem FLAG-USF1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper sc-8683) und transfiziertem FLAG-PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) wegen des ähnlichen Molekulargewichtes beider Proteine in zwei getrennten Blots überprüft. α-Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) diente bei jeder Western Blot Analyse als

6. Ergebnisse

Ladekontrolle. Die Signifikanz wurde mithilfe des „Student's t-Test“ bezogen auf mock bestimmt, wobei * signifikant verschieden von mock mit $p < 0.05$ und ** signifikant verschieden von mock mit $p < 0.01$.

Zusammenfassend konnte mittels Reporteranalysen und DNA pull-down Experimenten am PDX-1 Promotor gezeigt werden, dass USF1 im hier verwendeten Zellsystem an der Regulation der PDX-1 Genexpression antagonistisch mit PDX-1 beteiligt ist. Diese Regulation geschieht auf Promotorebene durch direkte Bindung an die DNA und gleichzeitiger Transrepression der Promotoraktivität, wobei dieser Effekt vermutlich aus einer Verringerung des mengenmäßigen Anteils des transaktivierenden Faktors PDX-1 (und eventuell weiterer transaktivierender Proteine) am PDX-1 Promotor resultiert. Die USF-Funktionen Transrepression und DNA-Bindung sind unter Glucosekarenz am PDX-1 Promotor am stärksten ausgeprägt, während sich eine CK2-Hemmung verstärkt unter Glucosekarenz negativ auf die DNA-Bindung von USF1 am PDX-1 Promotor auszuwirken scheint. Dieser Effekt lässt sich nach Normoglucose-Stimulus nicht verzeichnen, was darauf zurückzuführen sein kann, dass sich bei dieser Konzentration andere Bindungspartner und eventuell weitere CK2-Substrate an der PDX-1 DNA Sonde befinden, die ebenfalls durch eine Hemmung in ihrem Bindungsverhalten mit anderen Proteinen beeinflusst werden.

7. Diskussion

Die Einhaltung einer gleichbleibenden Glucosekonzentration im Blut (Glucosehomöostase) ist streng reguliert und überlebenswichtig. An dieser Regulation ist im Sinne einer blutzuckersenkenden Wirkung das Hormon Insulin maßgeblich beteiligt. Die Bildung von Insulin erfolgt in den β -Zellen des Pankreas, die damit eine herausragende Stellung bei der Regulation einer in engen Grenzen bleibenden Blutglucosekonzentration einnehmen. Die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase und Insulinbiosynthese/-sekretion wird durch eine Vielzahl von Enzymen und Transkriptionsfaktoren streng kontrolliert [7], woran nach neueren Erkenntnissen auch die USF-Proteine beteiligt sind [43]. In der Arbeitsgruppe Montenarh konnte zudem die Proteinkinase CK2 als eine der Modulatoren der Glucosehomöostase in den β -Zellen des Pankreas identifiziert werden, die den für das Wachstum und den Erhalt der β -Zellen wichtigen Transkriptionsfaktor PDX-1 phosphoryliert und so in seiner Funktion reguliert [183, 314].

Diese ersten Untersuchungen zu CK2 in den β -Zellen machten es interessant, eine mögliche Interaktion der CK2 mit den USF-Proteinen und ihre Rolle bei der Transkription und Sekretion von Insulin zu analysieren. Da sich Experimente in Inselzellen des Pankreas aufgrund ihrer Kultivierung als problematisch erweisen, wurde sich in der vorliegenden Arbeit der pankreatischen β -Zellen INS-1 aus Ratte bedient, die mehrere Vorteile gegenüber primären und anderen Zellkulturzellen aufweisen. Im Vergleich zu primärem Gewebe, als auch zu den murinen pankreatischen β -Zellen MIN6, in denen die bisher bekannten Untersuchungen zu CK2-Funktionen bei der Insulinenregulation durchgeführt wurden, lassen sich diese einerseits wesentlich leichter in Kultur halten, und behalten andererseits länger ihren typischen Glucose-responsiven Charakter [16]: Nach Inkubation der Zellen über Nacht in Glucose-freiem Medium sinkt die Insulin mRNA-Menge auf ein Minimum [30, 75], was dazu führt, dass direkt nach Glucosestimulation die Insulinbiosynthese in Gang gesetzt wird [111, 131, 214]. Die Insulinsekretion nimmt parallel dazu einen bipolaren Verlauf und das in Vesikeln gespeicherte Insulin wird nach 5-6 Minuten und nach einer Stunde, also biphasisch, sekretiert [35]. Die Glucosestimulation führt zudem zu einer schnellen Aktivierung von „immediate early genes“ wie Egr-1, welches die Transkription mehrerer Glucose-abhängiger Gene, wie zum Beispiel des Insulins [199] oder der L-Typ Pyruvatkinase [165], innerhalb weniger Stunden initiiert [78, 122], weshalb eine vierstündige Behandlung der Zellen mit Glucose die wichtigsten Ereignisse bei der Regulation der zellulären Glucosehomöostase erfasst. Das Zellkultur-Modell INS-1 bringt zur Untersuchung eines Einflusses von Glucose auch die Vorteile, dass systemische und organische Wirkungen

ausgeschaltet werden können, da lediglich β -Zell-spezifische Funktionen erfasst werden und eine gezielte Behandlung der Zellen mit geringen Mengen an Teststimuli oder Hemmstoffen durchgeführt werden kann. Nachteile bestehen allerdings darin, dass komplexe organübergreifende Interaktionen oder übergeordnete Regulationsmechanismen von Proteinen nicht erfasst werden können. Aufgrund der Immortalität der INS-1-Zellen können zudem durch längere Haltung in Kultur Zell-spezifische Funktionen verloren gehen. Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der INS-1-Daten auf den lebenden Organismus wurde alternativ noch murines Pankreasgewebe verwendet, um sich dort einen ersten Überblick über die Expression und subzelluläre Verteilung der untersuchten Proteine im Pankreas zu verschaffen. Die USF-Proteine und CK2 konnten im murinen Pankreasgewebe nachgewiesen werden, wobei die USFs vorrangig im Zellkern, und die CK2-Untereinheiten sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma lokalisiert sind, und die USFs und CK2 somit partiell colokalisiert im Pankreas vorliegen.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kietzmann (Oulu, Finnland) konnte bereits in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen eine Interaktion der USF-Proteine mit der CK2 identifiziert werden. Eine Interaktion von USF und CK2 wäre den Daten im murinen Pankreas zufolge auch in den INS-1-Zellen denkbar und könnte zu einer Phosphorylierung eines oder beider USF-Proteine führen. Für die CK2 sind bisher weit mehr als 400 Substrate identifiziert worden, unter denen sich auch viele Transkriptionsfaktoren befinden [175]. Auch in der Arbeitsgruppe Montenarh konnten schon einige Transkriptionsfaktoren als CK2-Substrate entdeckt werden, wie z.B. das ER-Stress Sensorprotein ATF4 [10], der Adipozyten-differenzierungsfaktor C/EBP δ [254] oder das für β -Zellwachstum und -erhalt wichtige Protein PDX-1 [183]. In *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten der Arbeitsgruppe Montenarh konnte nur USF1, nicht aber der USF1- und CK2-Bindungspartner USF2, als Substrat des CK2-Holoenzym bestätigt werden [273]. Erste Hinweise, dass USF1 ein Phosphoprotein ist, wurden erstmals 1991 nach Phosphatasebehandlung eines bakteriell aufgereinigten humanen Immundefizienzvirus-Transkriptionsfaktors (HIV-TF1) klar, dessen Dephosphorylierung zu einer reduzierten Transaktivierung des HIV-1 Promotors führte [160]. Nach weiteren Untersuchungen von HIV-TF1 stellten die Autoren aufgrund eines ähnlichen DNA-Bindungsverhaltens des HIV-TF1 am E-Box Motiv des HIV-1 Promotors die Theorie auf, dass es sich vermutlich um das USF1- oder eines USF-verwandten Protein handelt [160]. Dass USF1 auch *in vivo* ein Phosphoprotein darstellt, wurde 1997 bei Untersuchungen am C4 Komplementpromotor bewiesen [69]. Seit dieser Zeit wurden zahlreiche weitere Kinasen identifiziert, die USF1 an unterschiedlichen Stellen innerhalb seiner Aminosäuresequenz

phosphorylieren (siehe Abbildung 2). In Arbeiten am Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) Promotor konnte eine Phosphorylierung von USF1 an Threonin 153 durch den ERK1/2 (konventionelle Extrazellulär-regulierte Kinasen 1 und 2)-Signalweg beschrieben werden. Obwohl die Aktivität der USFs an diesem Promotor Zelltyp-spezifisch zu sein scheint [53, 202, 239], zeigt sich übereinstimmend in allen Arbeiten, dass die USF-Proteine als Antwort auf Wachstumssignale oder Wundverletzung an ein E-Box Motiv im PAI-1 Promotor binden [221, 316]. Auch die Stress-abhängige MAP-Kinase p38 α phosphoryliert USF1 an Threonin 153 als Antwort auf UV-Stress [44, 70]. In Folge dieser Phosphorylierung wird die Expression des Tyrosinasegens induziert und die Produktion von Melanin gestartet [70]. Außerdem scheint diese p38 α -abhängige Phosphorylierung von USF1 auch eine Rolle beim Schutz der Haut vor UV-induzierten DNA-Schäden zu spielen [22]. Auch für die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk2) wurde eine Phosphorylierung von USF1 im Bereich der Aminosäuren 143 bis 197 beschrieben [39]. Diese soll die DNA-Bindungsaktivität der USFs erhöhen und der Cdk2-abhängigen Phosphorylierung von c-Myc entgegenwirken [39, 108]. In neonatalen ventrikulären Rattenmyozyten wurde zudem *in vitro* und *in vivo* eine Phosphorylierung von USF1 durch die Proteinkinase C (PKC) propagiert. Die Phosphorylierung von USF1 soll dort dessen Bindungsaffinität am Herz- α -Myosin-schwere-Ketten-Promotor forcieren [321]. Auch für die Proteinkinase A (PKA) wurde eine Phosphorylierung von USF1 an Threonin 257 im bovinen System beschrieben [248]. Eine Überexpression der PKA in Granulosazellen führt nach Mutation von Threonin 257 in der Polypeptidkette von USF1 zu einer reduzierten Transaktivierungsfähigkeit der USFs am Prostaglandin G/H-2 Synthasepromotor und ist, nach der Autorenmeinung, demnach ein Indiz für eine PKA-abhängige Phosphorylierung von USF1 [248]. Als weitere wichtige USF1-phosphorylierende Kinase wurde 2009 die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) identifiziert [319], für die Wong *et al.* in Studien an Mäusen zeigten, dass nach Füttern oder Gabe von Insulin die DNA-PK am Fettsäuresynthasepromotor (FAS) dephosphoryliert wird, was ihrerseits zur Phosphorylierung von USF1 an Serin 262 durch die DNA-PK, und zur Aktivierung des FAS-Promotors führt [319, 320]. Als Letztes wäre noch die Glycogensynthasekinase-3 (GSK-3) mit ihren Isoformen α und β zu nennen, deren β -Isoform USF1 ebenfalls an Threonin 153 phosphoryliert, was laut Terragni *et al.* zur Inhibierung des PI3K-Weges und damit zur Aktivierung von Apoptose und Zellzyklusarrest führt, wohingegen eine Phosphorylierung an Serin 186 keinen Effekt auf die USF-abhängige Expression von Zellzyklus- und Apoptosegenen zu haben scheint [285]. Die Kenntnis, dass die USFs und CK2 nicht nur *in vitro* aneinander binden, sondern dies auch zu einer *in vitro*-Phosphorylierung von USF1

führt, und die Tatsache, dass Phosphorylierungen wichtige Elemente zur Regulation von Proteinaktivitäten darstellen, machte es spannend, die Interaktion der Proteinkinase CK2 mit den USF-Proteinen in Abhängigkeit von Glucose in INS-1-Zellen näher zu charakterisieren, und ihre Rolle in den pankreatischen β -Zellen zu definieren.

Um aneinander zu binden und einen Einfluss aufeinander ausüben zu können, müssen sich beide Proteine zur selben Zeit am selben Ort innerhalb der pankreatischen Zellen befinden. USF1 und USF2 sind in der Literatur als ubiquitär vorkommend beschrieben und wurden so bereits in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen [109, 227, 230, 268]. Übereinstimmend zeigt sich dabei überall, dass sie als klassische Transkriptionsfaktoren nach ihrer Synthese im Cytoplasma in den Zellkern der Zellen translozieren [66, 154], wo sie dann als typische Zellkernproteine nachzuweisen sind [28, 247]. Auch in INS-1-Zellen konnten die USF-Proteine durch andere Arbeitsgruppen bereits im Nukleus detektiert, und Funktionen innerhalb der pankreatischen β -Zellen beschrieben werden [9, 127, 224]. In Immunfluoreszenzanalysen sowie durch Western Blot Analyse nach Zellfraktionierung, konnten die USF-Proteine auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen nachgewiesen werden. Gemäß ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren zeigte sich, dass die USF-Proteine fast ausschließlich im Zellkern der pankreatischen β -Zellen lokalisiert sind, und dass die Zellkernlokalisation unabhängig von der Konzentration an Glucose ist. Zudem zeigte sich, dass sich auch kein signifikanter Unterschied in den USF-Proteinmengen in Abhängigkeit der Glucosekonzentration feststellen lässt. Dies korreliert mit den Daten von Lou *et al.*, die in den Zellkernextrakten gehungerter und gefütterter Ratten ebenfalls keine Unterschiede in den Proteinmengen der USFs detektieren konnten [151]. In mesangialen Zellen [240, 261, 312, 328] und in humanen proximalen Nierenzellen [301] hingegen, lässt sich die Expression von USF1 und USF2 durch Glucose induzieren, ebenso konnten in HepG2-Zellen unter Hochglucosebedingungen erhöhte Proteinlevel für USF1 und USF2 detektiert werden [200, 296]. In den β -Zellen des Pankreas war bisher über einen Glucose-Effekt auf die Expression und subzelluläre Lokalisation der USF-Proteine noch nichts bekannt. Allerdings wird in der Literatur ein Einfluss von Glucose auf die subzelluläre Lokalisation des pankreatischen Transkriptionsfaktors PDX-1 in den β -Zellen diskutiert [23, 57, 71, 93, 104, 157, 158, 215]. PDX-1, auch bekannt unter den Namen IDX-1 („Islet and Duodenal Homeobox 1“ [184], STF-1 („Somatostatin Transactivating Factor 1“ [143] oder IUF-1 („Insulin Upstream Factor 1“) [157]), ist einer der am besten untersuchten pankreatischen Transkriptionsfaktoren, welcher in den β - und δ -Zellen des endokrinen Pankreas und in Zellen des Duodenum und des sich entwickelnden Gehirns exprimiert wird [56, 88, 213, 279]. PDX-1 reguliert eine

Vielzahl von Genen, welche für den Erhalt der pankreatischen Zellidentität und -funktion wichtig sind [302, 310] und kann zudem auch seine eigene Expression regulieren [168]. Seine wichtigste Aufgabe besteht aber in der synergistischen Regulation der Transkription und Sekretion von Insulin nach Glucosestimulation, zusammen mit weiteren anderen pankreatischen Transkriptionsfaktoren [49, 54, 197, 211, 327]. In INS-1-Zellen zeigte sich, dass PDX-1 bei allen Glucosekonzentrationen zwar überwiegend nukleär, aber auch in geringem Maße cytoplasmatisch lokalisiert ist, während es keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsmengen, ähnlich wie bei den USF-Proteinen, in Abhängigkeit der Glucosekonzentration gibt. Bezüglich der Proteinmengen deckt sich dies mit den Beobachtungen von Andrali *et al.* [12] und Sabrina Klein [313] in MIN6-Zellen, die ebenfalls keinen Einfluss von Glucose auf die Expressionsmengen von PDX-1 detektieren konnten. Allerdings konnte für PDX-1 bereits in mehreren Arbeiten [157, 192, 193, 314] und auch in der Arbeitsgruppe Montenarh von Sabrina Klein in MIN6-Zellen [314] ein Glucose- und Zeit-abhängiges PDX-1-Shuttling vom Cytoplasma in den Zellkern der β -Zellen beschrieben werden, was in den hier verwendeten INS-1-Zellen nicht nachweisbar war. Dies deutet darauf hin, dass in den hier verwendeten pankreatischen β -Zellen der Ratte die Glucose-abhängige Regulation von PDX-1 nicht über die subzelluläre Lokalisation des Proteins geschieht.

Für die zelluläre Verteilung der CK2 wurde in der Literatur anfänglich stets eine vorwiegende Zellkernlokalisation beider Untereinheiten postuliert [134], welche aber in den letzten Jahren mehr und mehr korrigiert wurde. Beide CK2-Untereinheiten verteilen sich nach neueren Studien ubiquitär in den Zellen und diese Lokalisation kann sich auf verschiedene Stimuli hin Zelltyp-spezifisch ändern [8, 59, 60, 314, 323]. So konnte beispielsweise eine Lokalisation der CK2 zum einen an der Zellkernmembran im Cytoplasma von Mausembryofibroblasten detektiert werden [59, 60], als auch zum anderen an der ER-Membran und am Golgi-Apparat [58]. Eine nukleäre Lokalisation von CK2 α und CK2 β in Sertoli-Zellen scheint nur in 5 Tage alten Ratten der Fall zu sein, während die CK2-Untereinheiten in den Sertoli-Zellen erwachsener Tiere nur noch cytoplasmatisch lokalisiert sind [8]. Bezüglich der Lokalisation der CK2-Untereinheiten im Pankreas konnten in der Arbeitsgruppe Montenarh in den murinen pankreatischen β -Zellen MIN6 bereits erste Aussagen getroffen werden. Dort konnte gezeigt werden, dass sich die CK2-Untereinheiten bei Niedrigglucose im Cytoplasma der Zelle befinden und auf einen Glucosestimulus hin, zeitversetzt zu PDX-1, in den Zellkern der Zellen translozieren [57, 158, 314]. Was die Expression der CK2 in Abhängigkeit von Glucose betrifft, konnten in MIN6-Zellen keine signifikanten Unterschiede in den Proteinmengen festgestellt werden [313]. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation

bezüglich der subzellulären Lokalisation der CK2-Untereinheiten in den pankreatischen Rattenzellen INS-1, stimmen mit den Daten für die murinen β -Zellen MIN6 nur teilweise überein. Beide CK2-Untereinheiten konnten sowohl in Immunfluoreszenzanalysen, als auch biochemisch per Western Blot in INS-1-Zellen detektiert werden, wobei beide CK2-Untereinheiten α und β stets im Zellkern und im Cytoplasma der pankreatischen β -Zellen vorkommen, ein größerer Teil der CK2 α und CK2 β aber cytoplasmatisch lokalisiert ist, und sich diese Lokalisation in Abhängigkeit einer Glucosestimulation nicht verändert. Eine Glucose-abhängige Regulation der CK2, ähnlich zu den USFs und PDX-1, erfolgt somit nicht über die Expressionsmengen oder subzelluläre Lokalisation in den INS-1-Zellen. Aus den Lokalisationsstudien geht demzufolge hervor, dass USF1 und USF2 stets colokalisiert im Zellkern der β -Zellen vorliegen, und sich ein geringer Teil der Zellkern- und cytoplasmatisch-verteilten CK2 mit den USFs im selben Kompartiment der Zelle befindet. Komplexe aus den USFs und USF/CK2 sollten daher auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen nachzuweisen sein.

Aus den Daten der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von INS-1-Zellextrakten geht hervor, dass die USF-Proteine vorrangig als Dimere vorliegen, wenn auch einige wenige USFs gemäß den vorliegenden Analysen tetramere oder wenige höhermolekulare Komplexe auszubilden scheinen. Die Oligomerisierung der USFs wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen Zellen und Geweben untersucht [268, 269, 300]. Viollet *et al.* konnten 1996 in den Zellkernextrakten verschiedener untersuchter Zellen statistisch zeigen, dass die USFs vorrangig Dimere aus USF1 und der aktiven Form von USF2, USF2a, ausbilden (~70%), während Homodimere nur sehr selten vorkommen (~5-10%) [300]. Das Vorkommen höhermolekularer USF-Formen konnten Viollet *et al.* im Gel-Shift-Assay (EMSA) nicht detektieren, was darauf hindeutet, dass die USFs keine hochmolekularen Komplexe ausbilden [300]. Die höhermolekularen USF-Komplexe nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation in der vorliegenden Arbeit könnten demnach Komplexe aus USF1/USF2 und dem CK2-Holoenzym darstellen, welches zu einem geringen Teil mit beiden Proteinen in denselben Fraktionen colokalisiert ist. Neben dem CK2-Holoenzym könnten die höhermolekularen USF-Proteine auch Komplexe mit weiteren anderen Interaktionspartnern an der DNA darstellen. Es ist bekannt, dass die Interaktion der USFs mit generellen und Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sp1 [72, 147], MTF-1 [13] oder PDX-1 [9] zu einer kooperativen transkriptionellen Regulation einzelner Gene führt. Daher ist es möglich, dass die höhermolekularen USF-Formen solche DNA-gebundenen Komplexe, wie beispielsweise der USF/PDX-1-Komplex am proximalen PDX-1 Promotor, darstellen. Während die

bereits publizierte Bindung von USF1 und USF2 an das E-Box Motiv im proximalen PDX-1 Promotorbereich zum einen auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen bestätigt wurde [260], konnte zum anderen erstmals auch eine Bindung von PDX-1 an den proximalen Ratten PDX-1 Promotor nachgewiesen werden, die bisher nur am humanen und murinen distalen PDX-1 Promotor gezeigt werden konnte [180]. Analysen am murinen PDX-1 Promotor durch Amemiya-Kudo *et al.* konnten dahingehend zeigen, dass PDX-1, welches an die PH1-Domäne im distalen Promotorbereich bindet, einen „auto-loop“-Mechanismus vollzieht und mit den USF-Proteinen interagiert, die an das proximale E-Box Motiv gebunden sind [9]. Über weitere Cofaktoren interagiert PDX-1 so auch mit der generellen Transkriptionsmaschinerie und stimuliert seine eigene Expression [9]. Ein solcher Mechanismus wäre auch am Ratten PDX-1 Promotor denkbar, da PDX-1 funktionell nicht an E-Box Motive, sondern nur direkt an A-Boxen in den Promotorbereichen seiner Zielgene bindet [235], und über diese Bindung mit anderen E-Box bindenden Proteinen, wie E47/β2 oder den USFs, interagiert [259]. Da PDX-1 allerdings auch nach Mutation der proximalen E-Box an seinen Promotor bindet, scheint es über weitere, nicht E-Box bindende Cofaktoren an seinen proximalen Promotor zu binden und diesen zu regulieren, wie es z.B. auch Amemiya-Kudo *et al.* für Srebp-1c postulierten [9]. Ungeachtet der USF-Lokalisation, lassen sich nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation aber auch viele hochmolekulare CK2-Komplexe außerhalb der USF-Dimere detektieren, die stets aus CK2α und CK2β bestehen. Es ist bekannt, dass die CK2 nicht nur im klassischen Heterotetramer aus zwei katalytischen α/α' und zwei regulatorischen β-Untereinheiten in der Zelle vorliegt, sondern dass sie, vor allem auch in Abhängigkeit der zellulären Salzkonzentration, höhermolekulare Komplexe ausbilden kann [149, 249, 255, 292]. So konnte in einer aktuellen Untersuchung von Seetoh *et al.* beispielsweise gezeigt werden, dass sich bei niederen Salzkonzentrationen vorwiegend dimere oder trimere CK2-Heterotetramerkomplexe bilden, die oftmals einen Mix aus verschiedenen oligomeren CK2-Formen darstellen, die nicht nur der klassischen α₂/β₂-Zusammensetzung folgen [255]. Diese Zusammenlagerung der CK2 zu höhermolekularen Clustern scheint dabei ein wichtiger Mechanismus zur Regulation ihrer eigenen Aktivität darzustellen [149].

Aufgrund der Colokalisation der USFs und einem Teil der CK2 wäre es denkbar, dass eine direkte Interaktion beider Proteine im Zellkern der INS-1-Zellen stattfindet. So konnten nach Durchführung eines PLA-Assays in INS-1-Zellen viele Interaktionen der USF-Proteine mit beiden CK2-Untereinheiten detektiert werden, welche nur im Nukleus der Zellen nachzuweisen waren. Die Sensitivität dieses Assays ermöglichte es zudem, diese Assoziation der USFs und CK2 in den pankreatischen β-Zellen INS-1 zu quantifizieren und die USF/CK2-

Bindungsanalysen der Arbeitsgruppe Kietzmann zu bestätigen. In *in vitro* GST-pull-down-Experimenten zeigte sich in nachfolgenden Analysen der Arbeitsgruppe Montenarh, dass sowohl USF2, als auch USF1, an beide CK2-Untereinheiten binden [273], wobei die Bindung von USF2 an die katalytische α -Untereinheit der CK2 nur sehr schwach ist. Durch Coimmunpräzipitationsanalysen mit Zellkernextrakten konnte die Bindung beider USF-Proteine an das CK2-Holoenzym in der vorliegenden Dissertation auch in INS-1-Zellen bestätigt werden. Eine Behandlung der INS-1-Zellen mit 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose zeigte zudem, dass die USFs und CK2 auch unabhängig von der Glucosekonzentration aneinander binden. Da USF1 somit auch in den INS-1-Zellen an CK2 bindet, könnte es demzufolge auch in den pankreatischen Zellen durch die CK2 phosphoryliert werden.

Zur Analyse, ob an CK2 gebundenes USF1 auch in INS-1-Zellen durch die CK2 phosphoryliert wird, können verschiedene CK2-spezifische Hemmstoffe eingesetzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die CK2-Inhibitoren TBB, Quinalizarin und CX-4945 [45, 117, 169, 216, 266] verwendet, die als ATP-Analoga eine kompetitive Hemmung entfalten, und neben der CK2 nur wenige andere Kinasen in ihrer Aktivität hemmen [65, 205, 242]. Zum Ausschluss dieser Problematik wurden deshalb in zellulären Analysen stets mehrere Hemmstoffe parallel verwendet und Konzentrationen eingesetzt, die eine gute Inhibition der CK2-Aktivität in den INS-1-Zellen gewährleisteten. Die Sensitivität der einzelnen Hemmstoffe ist, neben ihrer Fähigkeit gut in das aktive Zentrum der CK2 α zu passen, zusätzlich abhängig von der molekularen Struktur des zellulären CK2-Komplexes, da die CK2, wie bereits diskutiert, auch höheroligomere Komplexe in der Zelle bildet [58, 60, 87, 145, 152, 156, 275, 276]. Die Verwendung der Hemmstoffe hat dabei sowohl Vorteile, als auch Nachteile. Zum einen ist es von Vorteil, dass sie einfach einzusetzen sind und oftmals zu einer guten Hemmung der CK2-Aktivität führen (siehe Abbildung 11). Zum anderen wird bei der Hemmstoff-Behandlung die CK2-Aktivität aller Zellen in einem Versuchsansatz inhibiert, da die Hemmstofflösung alle, und nicht nur einzelne Zellen gleichermaßen trifft. Nachteile der Verwendung von Inhibitoren bestehen allerdings darin, dass neben der CK2-Inhibition auch Seiteneffekte auftreten können. So ist dies einerseits die bereits angesprochene Tatsache nicht monoselektiv nur die Aktivität der CK2 zu hemmen [24, 46, 65, 65, 205, 242]. Andererseits wurde gerade für CX-4945 eine Funktion beim zellulären Spleißen identifiziert, die nichts mit CK2-Inhibition zu tun hat [129]. Neben dem Einsatz von spezifischen Hemmstoffen besteht allerdings auch die Strategie der Verwendung von Phosphorylierungsmutanten für USF1. So wurde sich in der vorliegenden Arbeit der USF1-Phosphorylierungsmutante_{T100A} bedient, welche durch Modifikation der CK2-Phosphorylierungsstelle (Threonin

an Position 100 wurde durch Alanin ersetzt) nicht mehr von der CK2 phosphoryliert werden kann. Jedoch stellt die Transfektionseffizienz der Mutanten ein kritischer Punkt dar, da es schwierig ist, 100% der Zellen in einem Ansatz zu transfizieren. Durch die Verwendung des Konstruktes, welches meistens zusätzlich zur Aminosäuresequenz des Proteins einen „Tag“ angefügt hat, kann es auch zu einer Änderung der räumlichen Struktur des Proteins kommen, was sich auf die Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten und Interaktionspartnern auswirken könnte. Desweiteren kann das endogene USF1 nach wie vor durch die CK2 phosphoryliert werden und mit der transfizierten Mutante bei zellulären Vorgängen konkurrieren. Durch Hemmung der CK2-Aktivität in INS-1-Zellen mit dem Inhibitor CX-4945 und anschließender Immunpräzipitation von USF2, konnten durch *in vitro*-Phosphorylierung am USF2-IP in der vorliegenden Dissertation erste Hinweise gefunden werden, dass USF1 vermutlich auch im verwendeten Zellsystem durch die CK2 phosphoryliert wird. Diese verdichteten sich durch Phosphatmarkierung und Immunpräzipitation von USF1 aus CX-4945 bzw. DMSO behandelten INS-1-Zellen und zeigten auf, dass USF1 auch *in vivo* durch die CK2 phosphoryliert wird.

Eine solche Phosphorylierung durch die CK2 kann unterschiedliche Auswirkungen auf ihre Substrate haben [317]. So kann sie die Dimerisierung und/oder Interaktion von Proteinen beeinflussen, wie sie dies z.B. beim Hitzeschockprotein Hsp90 [188] tut. Mollapour *et al.* konnten dahingehend zeigen, dass Hsp90 durch die CK2 an Threonin 22 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird [188], und dass dadurch die Interaktion von Hsp90 mit den Co-Chaperonen Cdc37^{p50} und hAha1 abgeschwächt und zusätzlich die Hsp90-Aktivität vermindert wird [188]. Der Einfluss einer CK2-Phosphorylierung auf die Interaktion von Proteinen ist beim Gerüstprotein XRCC1 besonders gut untersucht, welches eine wichtige Rolle bei der schnellen Reparatur chromosomaler DNA-Einzelstrangbrüche übernimmt [286]. Eine Phosphorylierung von XRCC1 in dessen C-terminalem Linker durch die CK2 ist essentiell für die Einzelstrang- und Basenexcisionsreparatur, da die Phosphorylierung von XRCC1 sowohl die Rekrutierung und Aktivierung der Polynukleotid-Kinase (PNK) [148], als auch der DNA-Ligase III [209] stimuliert, und somit die Assemblierung des XRCC1-Komplexes an Einzelstrangbrüche ermöglicht. Demnach spielt die CK2-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, und somit beim Erhalt der genetischen Integrität [148]. In der vorliegenden Dissertation zeigte sich in INS-1-Zellen, dass die CK2 auch einen Einfluss auf die Dimerisierung von USF1 und USF2 ausübt. Aufgrund des PLA-Assays und der Coimmunpräzipitation fördert eine CK2-Hemmung die Bindung beider USF-Proteine aneinander. Da die Anzahl an USF-Homodimeren in den Zellen

verschwindend gering ist [300], sind also gerade die heterodimeren Komplexe aus USF1 und USF2, deren Interaktion durch die CK2 beeinflusst wird, bei der Expression vieler Gene im Glucosestoffwechsel [281, 293, 295, 309], und auch speziell in den β -Zellen des Pankreas beteiligt [187, 224, 228]. Liegen weniger USF-Dimere in den Zellen vor, könnte dadurch die transkriptionelle Regulation verschiedener Glucose-abhängiger Gene verändert werden, indem zum einen USF-abhängige Transaktivierungs- oder DNA-Bindungsereignisse, und zum anderen USF-abhängige Interaktionen mit weiteren Cofaktoren an der DNA verändert stattfinden. Die CK2 trägt so auch in INS-1-Zellen möglicherweise als übergeordneter Regulator zur Glucosehomöostase bei, indem sie über die Phosphorylierung von USF1, ähnlich wie es für PDX-1 in den murinen pankreatischen MIN6-Zellen gezeigt werden konnte, die Transkription von Genen der Glucoseverwertung und Insulinproduktion reguliert. Dass eine CK2-abhängige Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoraktivität seines Substrates an spezifischen Promotoren beeinflussen kann, konnte auch in der Arbeitsgruppe Montenarh schon für mehrere andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. für ATF4 [10], C/EBP δ [254] oder auch für den bereits genannten pankreatischen Transkriptionsfaktor PDX-1 [183] gezeigt werden. Laut Literatur transaktiviert USF1 sowohl die Hämoxxygenase-1 (HO-1), als auch die Fettsäuresynthase (FAS) [102, 187, 224, 228, 305], weshalb dessen Transkriptionsfaktoraktivität auch durch die CK2 moduliert werden könnte.

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals auch in INS-1-Zellen gezeigt werden, dass USF1 die Expression der Hämoxxygenase-1 und Fettsäuresynthase positiv reguliert und somit zu einer gesteigerten Promotoraktivität führt. Ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes USF1 verstärkt die Aktivität des Promotors noch weiter, was zu der These führt, dass die CK2-Phosphorylierung einen negativen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von USF1 hat. Dies konnte mit allen verwendeten Hemmstoffen gezeigt werden, wobei der schwächste CK2-Effekt nach Behandlung mit CX-4945 zu verzeichnen war, der stärkste nach Behandlung mit Quinalizarin. Auch für andere Transkriptionsfaktoren konnte bereits eine reduzierte transkriptionelle Aktivität nach ihrer Phosphorylierung durch die CK2 identifiziert werden: für das CAAT/Enhancer-bindende Protein CHOP konnte sowohl durch Transfektion einer CHOP-Phosphorylierungsmutante, als auch durch Verwendung eines CK2-spezifischen Inhibitors gezeigt werden, dass ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes CHOP Transaktivierungsvorgänge besser in Gang setzen kann [290]. Damit werden durch eine CK2-Phosphorylierung CHOP-induzierte Funktionen wie DNA-Reparatur, Wachstumsarrest oder Apoptoseinduktion inhibiert, was mit der antiapoptotischen und proliferativen Funktion der CK2 in Säugerzellen korreliert. In den β -Zellen des Pankreas konnte in der Arbeitsgruppe

Montenarh auch für PDX-1 ein negativer Einfluss der CK2-Phosphorylierung auf dessen transkriptionelle Aktivität identifiziert werden. Rui Meng fand sowohl durch Transfektion von PDX-1- und CK2-Phosphorylierungsmutanten, als auch durch Verwendung CK2-spezifischer Inhibitoren in MIN6-Zellen heraus, dass ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes PDX-1 die Insulinpromotoraktivität und Insulinsekretion verstärkt stimuliert, und die CK2 demnach über ihre Kinaseaktivität als negativer Regulator der Insulinproduktion fungiert [183]. Sabrina Klein konnte weiterführend zeigen, dass die Aktivität der CK2 durch Stimulation mit Glucose in MIN6-Zellen erhöht wird, ohne dass eine gleichzeitige Änderung der CK2-Proteinexpression stattfindet [314]. Ein vergleichbarer und signifikanter Anstieg der CK2-Aktivität mit Zunahme der Glucosekonzentration konnte auch in der vorliegenden Arbeit in INS-1-Zellen beobachtet werden, der unter Hochglucosebedingungen möglicherweise aufgrund der β -Zell-Glucotoxizität und/oder oxidativem Stress [121, 282] wieder leicht reduziert war. Je höher die CK2-Aktivität ist, desto stärker könnte demnach eine PDX-1-, und auch USF1-Phosphorylierung, in den pankreatischen β -Zellen stattfinden. Für PDX-1 würde dies implizieren, dass dieses bei höheren Glucosekonzentrationen die Transkription und Sekretion von Insulin nur schwach induzieren könnte, während für USF1 bis dato keine Daten über seine Glucose-induzierte Insulingenregulation in Abhängigkeit seiner Phosphorylierung durch die CK2 vorlagen. Da der *in vitro*-CK2-Kinasesassay allerdings mit einem synthetischen Substratpeptid durchgeführt wird, ist es schwer die CK2-Aktivität in direkten Bezug zur Phosphorylierungsfähigkeit endogener Substrate, wie PDX-1 oder USF1, zu setzen, da diese nicht exakt die optimale CK2-Konsensussequenz S/TxxE/DpY enthalten. Zudem werden durch einen Glucosestimulus zahlreiche verschiedene zelluläre Prozesse induziert, die Proteinstabilitäten, Genexpressionen oder andersartige posttranslationale Modifikationen verschiedenster Proteine bedingen, welche über sekundäre Wege die Kinaseaktivität der CK2 hochregulieren, und so zu einer gesteigerten Phosphorylierung anderer CK2-Substrate führen könnte.

Da die CK2-Aktivität nach den bisherigen Ergebnissen einen negativen Einfluss auf das Transaktivierungspotential von USF1 hat, war es denkbar, dass die CK2 auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen, in Analogie zur transkriptionellen PDX-1-Aktivität in MIN6-Zellen, USF1-abhängige Gene der Glucoseverwertung und Insulinproduktion negativ beeinflusst. Ein USF-abhängig reguliertes Gen in den β -Zellen ist die Glucokinase (GK), die einen wichtigen Faktor bei der initialen Verwertung aufgenommener Glucose darstellt, da sie die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf Glucose katalysiert und so für die Bildung von Glucose-6-Phosphat im Glucosemetabolismus verantwortlich ist [142, 170, 177, 220].

Die Verteilung und Regulation der Glucokinase findet Zell-spezifisch statt, wobei das Enzym vorrangig in pankreatischen β -Zellen und Leberhepatozyten gefunden werden kann und dort aktiv ist [162, 176, 311]. Heterozygote Mutationen des Enzyms sind mit der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 [67, 95, 277] oder von „Maturity Onset Diabetes of the Young 2“ (MODY2) assoziiert [32, 185, 274, 284], während eine homozygote Mutation der Glucokinase in einem kompletten Genverlust resultiert [5, 14]. Durch alternatives Spleißen und Verwendung zweier unterschiedlicher erster Exons in Leber und in Inselzellen entstehen zwei unterschiedliche GK cDNAs [97, 113, 114], deren Transkription auch von zwei unterschiedlichen Promotoren initiiert wird [161, 163, 164]. Die Transkription der β -Zell-spezifischen Glucokinase wird dabei von einem „upstream“ Promotor gestartet, der keinerlei Sequenz-Ähnlichkeiten zum Leberzell-spezifischen Promotor besitzt [118, 164]. Im Jahr 1992 wurde gezeigt, dass dieser Promotor verschiedene Kontroll-Motive besitzt. Das evolutionär konservierte UPE3-Motiv ist dabei essentiell für die Aktivität der GK [107], da es ein E-Box Motiv an Position -221 bis -216 enthält, an das NeuroD1/ β 2 und USF1 binden [187]. Allerdings konnten die Autoren keine verstärkte Aktivität dieses Promotors nach Transfektion von USF1 oder USF2 alleine detektieren [187]. In der vorliegenden Dissertation konnte nach Überexpression von USF1 in INS-1-Zellen eine deutliche Aktivitätssteigerung des pankreatischen Glucokinase-promotors verzeichnet werden. Diese ließ sich auch nach Hemmung der CK2-Aktivität noch weiter verstärken und zeigt erneut deutlich auf, dass ein nicht durch die CK2-phosphoryliertes USF1 Transaktivierungsvorgänge besser in Gang setzen kann. Dies ist nur teilweise mit den Daten von Sabrina Klein in MIN6-Zellen stimmig [133], die keinen Einfluss der CK2 auf die PDX-1-abhängige Expression der Glucokinase detektieren konnte und zeigt damit, dass die CK2 möglicherweise nur an der USF1-abhängigen Regulation des pankreatischen Glucokinasepromotors in INS-1-Zellen beteiligt ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Transaktivierungsdaten von USF1 am Glucokinasepromotor der vorliegenden Arbeit und von Moates *et al.* könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Reporteranalysen in den Glucose-responsiven pankreatischen β -Zellen INS-1 durchgeführt und boten somit das physiologische Umfeld der pankreatischen Glucokinase, um Transaktivierungsvorgänge untersuchen zu können. Die Reporterstudien nach Überexpression des pankreatischen Glucokinasepromotors und der USF-Proteine von Moates *et al.* wurden hingegen in Baby-Hamster-Nierenzellen durchgeführt. Dies lässt vermuten, dass einerseits Nierenzellen nicht alle Transkriptionsfaktoren exprimieren, die für eine USF-abhängige Regulation des pankreatischen Glucokinasepromotors notwendig sind und

andererseits, dass die USF1-abhängige Transaktivierung des pankreatischen Glucokinasepromotors in INS-1-Zellen mit anderen, weiteren β -Zell-spezifischen USF-Interaktionspartnern, wie z.B. mit NeuroD1/ β 2, oder anderen allgemeinen Transkriptionsfaktoren am E-Box Motiv synergistisch stattfindet [187].

Ein weiteres wichtiges Gen in den β -Zellen des Pankreas ist Insulin, welches ebenfalls USF-abhängig reguliert wird. Insulin stellt ein lebenswichtiges Proteohormon dar, welches nur in den β -Zellen des Pankreas gebildet, und von dort aus ins Blut sezerniert wird. Seine Schlüsselfunktion besteht schließlich darin, andere Zellen zur Glucoseaufnahme aus dem Blut anzuregen und so den Blutzuckerspiegel nach kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme zu senken [232]. Reguliert wird Insulin zum einen in den pankreatischen β -Zellen auf Ebene der Sekretion nach Glucosestimulus, und zum anderen auf Ebene der Transkription, indem dessen Promotoraktivität durch die Bindung einer Vielzahl von β -Zell-spezifischen und ubiquitären Transkriptionsfaktoren an „Enhancer-Regionen“ kontrolliert wird [96, 179]. Dabei liegen diese „Enhancer-Regionen“ in unmittelbarer Nähe zueinander und kontrollieren die Transkription des Insulins durch additive und synergistische Interaktionen der gebundenen Proteine untereinander [73, 79, 225]. Das wenig konservierte E-Box Motiv IEB2 in der Ratte bindet dabei den Insulin Enhancer Faktor 1 (IEF-1) [201, 207], während am humanen IEB2 eine Bindung der USF-Proteine festgestellt wurde, ohne jedoch Untersuchungen bezüglich deren Transaktivierungspotential am Promotor durchzuführen [228]. Read *et al.* schlussfolgerten lediglich aus Sequenzvergleichen mit dem Ratten-IEB2-Motiv, dass diese Region wichtige regulatorische Funktionen als Mini-Enhancer, vor allem in Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren bei der Glucose-responsiven Kontrolle der Insulinexpression übernehmen könnte [228]. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Überexpression von USF1 eine starke Aktivitätsminderung des Ratten Insulin 1 Promotors (RIPI) in INS-1-Zellen detektiert werden, was zu einer Reduktion der Insulintranskription um fast 90% führte. Sowohl im humanen, als auch im Ratten Insulin 1 Promotor konnten mehrere „CANNTG“ Konsensussequenzen identifiziert werden, die bHLH-Proteine binden können und beim humanen Insulinpromotor auch teilweise innerhalb eines „negativen regulatorischen Elementes“ (NRE) liegen [96]. Die NRE scheint dabei konträre Eigenschaften zu besitzen, indem sie zum einen als potenter Glucose-responsiver transkriptioneller Enhancer in primären Inselzellen fungiert, während sie zum anderen als transkriptioneller Repressor in immortalisierten und nicht- β -Zellen gilt [241]. Auch wenn es keinerlei Anzeichen für das Vorkommen einer NRE im Ratten Insulin 1 Promotor gibt [126, 303], kann es aufgrund der Sequenzunterschiede der Promotoren beider Spezies dennoch der Fall sein, dass eine

abweichende Sequenz im Rattenpromotor als minimale inhibitorische Region dient, und die identifizierten „CANNTG“-Konsensussequenzen beim Ratten Insulin 1 Promotor möglicherweise innerhalb einer NRE-Region liegen. Die starke Transrepression der Insulinpromotoraktivität durch USF1-Überexpression in den pankreatischen β -Zellen INS-1 ließe sich dann dadurch erklären, dass USF1 an diese negativ regulierenden „CANNTG“-Elemente bindet. Eine weitere mögliche Erklärung könnte auch sein, dass durch die Überexpression von USF1 das Gleichgewicht an aktivierenden und reprimierenden Proteinen, welche die Transkription des Insulins steuern, verschoben wurde, und z.B. das transaktivierende Protein PDX-1 [173] am Promotor verdrängt wurde. Wie bereits vorher schon diskutiert, konnte die PDX-1-abhängige Transaktivierung des Ratten Insulin 1 Promotors auch in der Arbeitsgruppe Montenarh in den murinen pankreatischen β -Zellen MIN6 gezeigt werden [183]. Rui Meng konnte desweiteren erstmals zeigen, dass die Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 das PDX-1-Transaktivierungspotential am Insulinpromotor abschwächt [183]. Für die CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 konnte in INS-1-Zellen nach Hemmung der CK2 mit den verschiedenen Inhibitoren CX-4945, TBB und Q ebenfalls eine Abschwächung der USF1-Transkriptionsfaktoraktivität am Insulinpromotor detektiert werden, wenn die USF1-abhängige Repression auch nicht komplett aufhebbar war. Damit fungiert die CK2 nicht nur über ihren Einfluss auf die Interaktion von USF1 und USF2, sondern auch über die Beeinflussung der Transkriptionsfaktorfähigkeit von USF1 und von PDX-1 als negativer Regulator der Expression des Insulins in den pankreatischen β -Zellen. Auch das E-Box Protein E47, welches ebenfalls ein Substrat der CK2 ist [120], könnte in seiner transkriptionellen Aktivität bei der Insulingenexpression in den β -Zellen beeinflusst werden [197]. Für E47 konnte dabei in Muskelzellen bereits gezeigt werden, dass durch CK2 phosphorylierte E47-Proteine nicht weiter an DNA binden können und auch die Homodimer-basierte Muskel-spezifische Transkription drastisch reduziert ist [120]. Eine Hemmung der CK2-Aktivität führt demnach über die gleichzeitige Inhibition der Phosphorylierung mehrerer verschiedener CK2-Substrate, die an der Transkription von Insulin beteiligt sind, zu einer verstärkten Aktivität des Insulinpromotors. Da PDX-1 nicht nur Substrat der CK2 ist, sondern auch ein Zielgen der USF-Proteine darstellt [12], könnte die CK2-abhängige Regulation des Insulinpromotors so auch über eine USF1-abhängige Regulation von PDX-1 stattfinden, welches seinerseits die Transkription des Insulins stimuliert.

Durch Promotordeletionen und Mutationen regulatorischer Sequenzen konnten Sharma *et al.* 1996 erstmals zeigen, dass an das E-Box Motiv an Stelle -107 bis -102 des proximalen Ratten

PDX-1 Promotors die USF-Proteine binden, und diese Bindung zudem essentiell für die PDX-1 Promotoraktivität ist [260]. In Analysen von Qian *et al.* wenige Jahre später in INS-1-Zellen, konnten diese durch Überexpression einer dominant-negativen USF-Mutante, welche zwar zur Dimerisierung mit anderen bHLH-Proteinen fähig ist, aber nicht mehr an DNA binden kann, nachweisen, dass dadurch die PDX-1 Promotoraktivität, mRNA- und Proteinmenge abnimmt [224]. Desweiteren konnten sie durch die Überexpression der USF-Mutante ebenfalls eine signifikante Reduktion der Insulin mRNA zeigen, woraus sie schlussfolgerten, dass dies aus einer Abnahme des PDX-1 Proteinlevels in der Zelle, und damit einer fehlenden PDX-1 Bindung an die A-Box im Insulinpromotor resultiert [224]. Die Autoren postulierten aus den erhaltenen Ergebnissen die Wichtigkeit der E-Box an Position -104 und die Funktion der USFs als transkriptionelle Aktivatoren des proximalen Ratten PDX-1 Promotors [224]. In der vorliegenden Dissertation konnte in INS-1-Zellen gezeigt werden, dass die Aktivität des Ratten PDX-1 Promotor nach Überexpression von USF1 signifikant reduziert wird und USF1 somit auch als Repressor der PDX-1 Genexpression in Ratte agiert. Die Diskrepanz mit den Ergebnissen von Qian *et al.* könnte darauf beruhen, dass Qian *et al.* zum Nachweis der Promotoraktivität nach Überexpression der dominant-negativen USF-Mutante nur den PDX-1 Minimalpromotor benutzt haben, welcher nur den kurzen proximalen Bereich mit der einzelnen E-Box abdeckt [224, 260]. Im distalen Bereich des PDX-1 Promotors befindet sich allerdings ein Enhancer, der essentiell für die volle Aktivität des PDX-1 Promotors ist [259]. Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Expression von PDX-1, in Analogie zu Insulin, stets synergistisch mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. E47/β2 und HNF-3β stattfindet, die an den Promotor im distalen Bereich binden [259]. Daher scheint auch das Verhältnis aller regulierenden Faktoren an diesem Promotor genau dosiert zu sein, und eine Verschiebung des Gleichgewichtes an aktivierenden und reprimierenden Proteinen zu einem drastischen Effekt auf die PDX-1-Expression zu führen. Durch Überexpression einer dominant negativen USF-Mutante wurde bei Qian *et al.* zudem die Bindung der USF-Proteine und dadurch möglicherweise die gleichzeitige Bindung transaktivierender Proteine, wie z.B. von PDX-1 selbst, unterbunden [26], was zu der reduzierten Aktivität des Promotors geführt haben könnte. Dass PDX-1 seinen eigenen Promotor transaktivieren kann und die Dosis an aktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktoren ausschlaggebend für die PDX-1 Expression ist, konnte auch in den hier verwendeten INS-1-Zellen am Ratten PDX-1 Promotor gezeigt werden. Werden gleiche Mengen an USF1 und PDX-1 transfiziert, scheint die Aktivität des Promotors auf einem basalen Level zu bleiben. Sobald man die Mengen an reprimierendem USF1 und

transaktivierendem PDX-1 variiert, wird der Promotor entweder durch ein Überangebot an USF1 reprimiert, oder durch ein Überangebot an PDX-1 verstärkt aktiviert. Damit zeigt sich, dass USF1 zwar ein negativer Regulator der PDX-1 Transkription darstellt, dieser Effekt aber erst zum Tragen kommt, wenn es vermehrt in der Zelle vorliegt. Die verminderte PDX-1 Transaktivierung nach USF1-Überexpression führt so zu einer geringeren Menge an PDX-1 Protein in den Zellen, was so auch die verringerte Transkription des Insulins nach USF1-Überexpression erklärt. Eine Hemmung der CK2-Aktivität in den INS-1-Zellen schwächt in Analogie zum Insulinpromotor auch die USF1-abhängige Repression der PDX-1 Promotoraktivität ab, was erneut verdeutlicht, dass die CK2 damit über ihren Einfluss auf die PDX-1 Genexpression als negativer Regulator der Insulinproduktion fungiert. Eine CK2-Hemmung führt demnach über eine positive Regulation der PDX-1-Transkription zu einer verstärkten Insulingenexpression, und dient somit als wichtiger Mechanismus um die Insulinproduktion in den pankreatischen β -Zellen anzutreiben.

Die Behandlung der pankreatischen Zellen mit Glucose ist der wichtigste Stimulus zur Insulinproduktion in den β -Zellen. Glucose induziert zahlreiche verschiedene Prozesse in den Zellen, wobei vor allem auch Genexpressionen durch Glucose beeinflusst werden. In Leber- und Fettzellen, und in den β -Zellen des Pankreas sind zahlreiche Gene beschrieben, die Glucose-abhängig reguliert werden [186, 231], wie z.B. die Glucokinase [170, 171, 177], die Fettsäuresynthase [63], die L-Typ-Pyruvatkinase [128, 165], und in den β -Zellen des Pankreas vor allem Insulin [55, 210] und PDX-1 [181, 215]. Die Glucose-abhängigen Gene besitzen in ihren Promotorbereichen oftmals sogenannte „Glucose-induzierbare responsive Elemente“ (GIRE), die erstmals bei Promotoranalysen der L-Typ Pyruvatkinase identifiziert wurden [47]. Dabei entdeckte man auch, dass das Glucose-responsive Element dort aus E-Boxen, oder E-Box ähnlichen Sequenzen aufgebaut ist, welche sich in ähnlicher Form auch bei den Glucose-abhängigen Genen SPOT14/S14 [264] und Fettsäuresynthase [77, 287] in der Leber nachweisen ließen. Ebenso konnte man eine Bindung der USF-Proteine in späteren Studien an diese E-Boxen bestätigen [52, 64, 263]. Genauere Analysen der GIRE zeigten auch, dass die Glucose-responsiven Elemente vieler anderer Leber-, Fett- und β -Zell-spezifischer Gene in ihren Sequenzen solche E-Box Motive beinhalten, wobei Mutationen in den USF-bindenden E-Box Motiven, oder eine fehlende Bindung der USFs an diese E-Boxen oftmals zu einer gestörten Glucose-abhängigen Expression USF-abhängiger Zielgene führt [293, 294]. Dies ist z.B. bei der L-Typ Pyruvatkinase [52], der Fettsäuresynthase [34, 305], der Glucokinase [112], bei PDX-1 [180, 224] oder bei Insulin [228] der Fall. Oftmals können diese fehlenden oder verminderten Genprodukte so zur sekundären Entstehung von Diabetes

mellitus [6, 67, 68, 95, 141, 181, 208, 278, 294] beitragen, und verdeutlichen erneut die wichtige Funktion der USF-Proteine beim Erhalt der zellulären Glucosehomöostase.

Eine Glucose-abhängige Stimulation der Transkription der PDX-1- und Insulingene konnte in der vorliegenden Arbeit in INS-1-Zellen gezeigt werden. Mit zunehmender Glucosekonzentration nimmt die Aktivität des PDX-1- und Insulinpromotors zu, wobei sie bei höheren Konzentrationen auch wieder leicht rückläufig wird. Wie bereits vorher schon diskutiert, wird auch gleichzeitig die CK2-Aktivität in den INS-1-Zellen durch Glucose stimuliert. Überexprimiert man USF1 und setzt die INS-1-Zellen nach Glucosekarenz anschließend verschiedenen Glucosekonzentrationen aus, erkennt man, dass die PDX-1- und Insulinpromotoraktivität auch in Anwesenheit unterschiedlicher Glucosemengen nach wie vor durch USF1 reprimiert wird. Diese USF1-abhängige Repression der Promotoraktivitäten lässt sich aber durch Glucose partiell abschwächen. Eine gleichzeitige Behandlung der pankreatischen Zellen mit Glucose und CK2-Inhibitoren zeigt weiterhin, dass Glucose die USF1-abhängige Repression des PDX-1 Promotors nach wie vor abschwächt, eine gleichzeitige CK2-Hemmung aber keine weitere Verstärkung dieser Glucose-bedingten Abschwächung bewirkt. In weiteren Analysen wäre es daher auch sinnvoll, den Versuch mit der USF1-Phosphorylierungsmutante zu wiederholen, die nicht durch die CK2 phosphoryliert werden kann. Dadurch könnte eine genauere Aussage über die Spezifität der Glucose bzw. der CK2 auf die USF1-abhängige Regulation des PDX-1 Promotors getroffen werden. Da eine Hemmung der CK2-Aktivität die USF1-abhängige Repression allerdings nach wie vor partiell aufhebt, ist die CK2-Phosphorylierung so zwar mit verantwortlich für die Repression des PDX-1- und Insulinpromotors in den β -Zellen, scheint aber eine untergeordnete Rolle zur Glucosewirkung einzunehmen, da sich beide Effekte nicht additiv zueinander verhalten. Dies ist aber nicht verwunderlich, da durch eine CK2-Hemmung nur der Bruchteil an Stoffwechselwegen beeinflusst wird, bei dem die CK2 in den β -Zellen involviert ist, während durch Glucose eine größere und dominante Vielzahl an Prozessen in den β -Zellen variiert wird, und sich Phosphorylierungsereignisse möglicherweise auf einer anderen, weniger relevanten Ebene auswirken [250, 298]. So können durch Glucose auch Phosphorylierungsereignisse begünstigt werden, wodurch z.B. die Interaktion mit anderen Proteinen und die Bindefähigkeit an Ziel-DNA modifiziert wird [115]. Dass Phosphorylierungen von USF1 dessen DNA-Bindungsfähigkeit an Promotor-DNA verändern kann, wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt [39, 321], während ein Einfluss von Glucose auf die Phosphorylierungs-abhängige DNA-Bindung von USF1 (oder USF2) bisher noch nicht analysiert wurde. Allerdings ist bekannt, dass Glucose alleine ebenfalls die DNA-Bindung der

USFs [123, 200, 296] und deren Interaktion mit anderen Proteinen an der DNA, wie z.B. mit HIF-1 α [136], Chrebp oder Srebp-1c [48], verändern kann. Daher wäre es möglich, dass die durch Glucose- und CK2-Hemmung induzierte Abschwächung der USF1-Repression am PDX-1- und Insulinpromotor aus einem unterschiedlichen Bindungsverhalten der USFs oder USF-interagierender Faktoren an der DNA resultiert. Dies macht besonders dahingehend Sinn, da sowohl der PDX-1-, als auch der Insulinpromotor stets synergistisch mit anderen allgemeinen und β -Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert wird [197, 256, 259]. Desweiteren könnte es auch der Fall sein, dass nicht nur USF1, sondern auch die USF-Bindeproteine, wie z.B. PDX-1, an der DNA posttranslationalen Modifikationen aufgrund erhöhter Glucosekonzentrationen erliegen und z.B. deren Phosphorylierung durch die CK2 eine erhöhte DNA-Bindung und/oder Transaktivierung induziert, die dem hemmenden USF1-Effekt entgegenwirkt.

Interessanterweise zeigte sich, dass keine der CK2-Untereinheiten α oder β zusammen mit den USF-Proteinen und PDX-1 an die proximale E-Box im PDX-1 Promotor bindet. Es sind allerdings in der Literatur nur sehr wenige Enzyme bekannt, die direkt an die DNA binden. Die einzige bekannte DNA-bindende Kinase stellt die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) dar [11, 271], die erst durch ihre Bindung an DNA aktiviert wird und dann eine Vielzahl DNA-bindender Proteine phosphoryliert, wie z.B. auch das USF1 [319]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 (und möglicherweise auch von PDX-1) vor oder nach dessen Bindung an die PDX-1 Promotor DNA stattfindet. Wie bereits erwähnt, fördern aber einige USF1-phosphorylierende Kinasen die Bindungsfähigkeit der USF-Proteine an einer bestimmten Ziel-DNA, wie dies z.B. für die Cdk2 [39] oder PKC [321] der Fall ist, und auch für die CK2 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung ebenso die DNA-Bindungsfähigkeit ihres Substrates modulieren kann, wie dies z.B. für Sp1 [15] oder p53 [222, 223] gilt. Dabei kann eine CK2-Phosphorylierung die DNA-Bindung ihres Substrates sowohl verschlechtern, wie dies für Sp1 der Fall ist [15], als auch essentiell und förderlich für ihre DNA-Bindung sein, wie dies für p53 gilt [222, 223].

Hemmt man die CK2-Aktivität in INS-1-Zellen mit spezifischen Inhibitoren zeigt sich übereinstimmend, dass USF1 schlechter an das proximale E-Box Motiv des Ratten PDX-1 Promotors bindet. Dies zeigt sich auch nach Überexpression einer USF1-Phosphorylierungsmutante, die nicht durch die CK2 phosphoryliert werden kann. Eine CK2-abhängige Phosphorylierung von USF1 fördert demnach dessen DNA-Bindung an den proximalen PDX-1 Promotor, und das durch CK2-phosphorylierte USF1 kann dessen Aktivität verstärkt

hemmen. Die Abschwächung der USF1-abhängigen Transrepression des PDX-1 Promotors nach Hemmung mit CK2-Inhibitoren resultiert demnach aus einer verminderten Bindung von USF1 an den Promotor, weshalb die PDX-1 Transkription wieder verstärkt in Gang gesetzt werden kann. PDX-1 kann dann gemäß seiner zellulären Funktion die Insulintranskription verstärkt regulieren, was auch eine weitere mögliche Erklärung für die Abschwächung der USF1-abhängigen Transrepression des Insulinpromotors nach CK2-Hemmung wäre. Demnach agiert die CK2 durch Modulation der USF1-abhängigen DNA-Bindungsfähigkeit als negativer Regulator der Transkription des Insulingens und der Insulinproduktion in den β -Zellen des Pankreas. Für den USF1-Interaktionspartner und das CK2-Substrat PDX-1 am PDX-1 Promotor konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten nach CK2-Hemmung detektiert werden, was darauf hindeutet, dass PDX-1 seinen eigenen Promotor unabhängig von einer CK2-Phosphorylierung antagonistisch mit USF1 reguliert. Die PDX-1-Bindungsergebnisse zeigen außerdem, dass die PDX-1 Bindung nicht nur über USF1 am E-Box Motiv, sondern möglicherweise auch über andere Proteine, wie z.B. USF2, geschehen muss. Eine CK2-abhängige Phosphorylierung von PDX-1 beeinflusst demnach nicht dessen möglichen „auto-loop“-Mechanismus bei der PDX-1 Genregulation. Aus den DNA-Bindungsanalysen ist ebenfalls zu schließen, dass es durch die CK2-Hemmung zu einem Ungleichgewicht von USF1 und PDX-1 am PDX-1 Promotor kommt, wodurch reprimierendes USF1 an der DNA wegdiffundiert, und transaktivierendes PDX-1 trotzdem aktiv sein kann, was zum einen die dosisabhängige, antagonistische Regulation der PDX-1 Genexpression durch USF1 und PDX-1, und zum anderen erneut die Abschwächung der Transkription der PDX-1- und Insulingene nach CK2-Hemmung erklärt.

Da auch Glucose bei der PDX-1 Genregulation eine Rolle spielt, wurde das Bindungsverhalten der USF-Proteine und von PDX-1 am PDX-1 Promotor auch bei verschiedenen Glucosekonzentrationen in INS-1-Zellen untersucht. Während für die USFs keine Effekte von Glucose bezüglich ihres DNA-Bindungsverhaltens in pankreatischen β -Zellen bekannt sind, konnte für PDX-1 bereits gezeigt werden, dass Glucose dessen DNA-Bindungs- und Transaktivierungspotential am Insulinpromotor fördert [12]. Der Einfluss von Glucose auf die PDX-1-abhängige Regulation des Insulinpromotors wurde bisher noch in keinem Organismus genauer untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte in INS-1-Zellen gezeigt werden, dass die Bindung von USF1 und USF2 am proximalen E-Box Motiv des PDX-1 Promotors mit steigender Glucosekonzentration abnimmt. Dabei hat Glucose den größeren Einfluss auf die USF1-Bindung, die unter Hochglucose auf ein Minimum sinkt. Dies passt auch zur gängigen Literaturmeinung, die eine Dysregulation von USF1, und nicht unbedingt von USF2, als

kritischen Faktor bei der Regulation der zellulären Glucosehomöostase, und bei der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 [101, 198] und Dyslipidämien [196] sieht. Die Bindung von PDX-1 an der PDX-1 Sonde wird hingegen kaum durch Glucose verändert und nimmt lediglich bei 25 mM Glucose leicht ab, was aber auch aus der verminderten USF-Menge am Promotor resultieren könnte, da PDX-1 vermutlich auch über eines oder beide USFs am E-Box Motiv bindet [9]. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die USFs unter Glucosekarenz am stärksten an den PDX-1 Promotor binden. Dies passt ebenfalls zu den Reportergenanalysen am PDX-1 Promotor nach Glucosestimulation, die die stärkste USF1-Repression bei 0 mM Glucose zeigten und macht auch dahingehend Sinn, dass die USF-Proteine als negative Regulatoren der PDX-1 Expression diese unter Glucosekarenz am ehesten modulieren, wo die β -Zelle nicht zur Glucose-stimulierten Insulinsekretion induziert wird und demnach weder die Transkription von PDX-1-, noch die von Insulin in Gang gesetzt wird.

Eine parallele Stimulation der INS-1-Zellen mit Glucose und CK2-Inhibitoren zeigte weiterführend, dass der Einfluss einer CK2-Phosphorylierung vermutlich nur bei Glucosekarenz maßgeblich zum Tragen kommt, und unter diesen Bedingungen verstärkt die Bindung von USF1 am PDX-1 Promotor reguliert wird. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die CK2 eine Art „finetuning“ bei der Glucose-abhängigen Transrepression des PDX-1 Promotors durch USF1 übernimmt, um so möglicherweise das Gleichgewicht an transaktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktoren am PDX-1 Promotor, und damit die PDX-1 Genexpression in Abhängigkeit von Glucose, zu steuern. Diese Steuerung der PDX-1 Expression reguliert ihrerseits die Transkription und Produktion von Insulin in den β -Zellen. Eine CK2-Hemmung kann somit ein entscheidendes Target zum Erhalt der β -Zellfunktion in den pankreatischen Zellen darstellen.

Die bisher erhaltenen Erkenntnisse bezüglich der PDX-1- und Insulingenregulation durch die USFs, PDX-1 und der CK2 in pankreatischen β -Zellen lassen sich in folgendem Schaubild zusammenfassen (Abbildung 40):

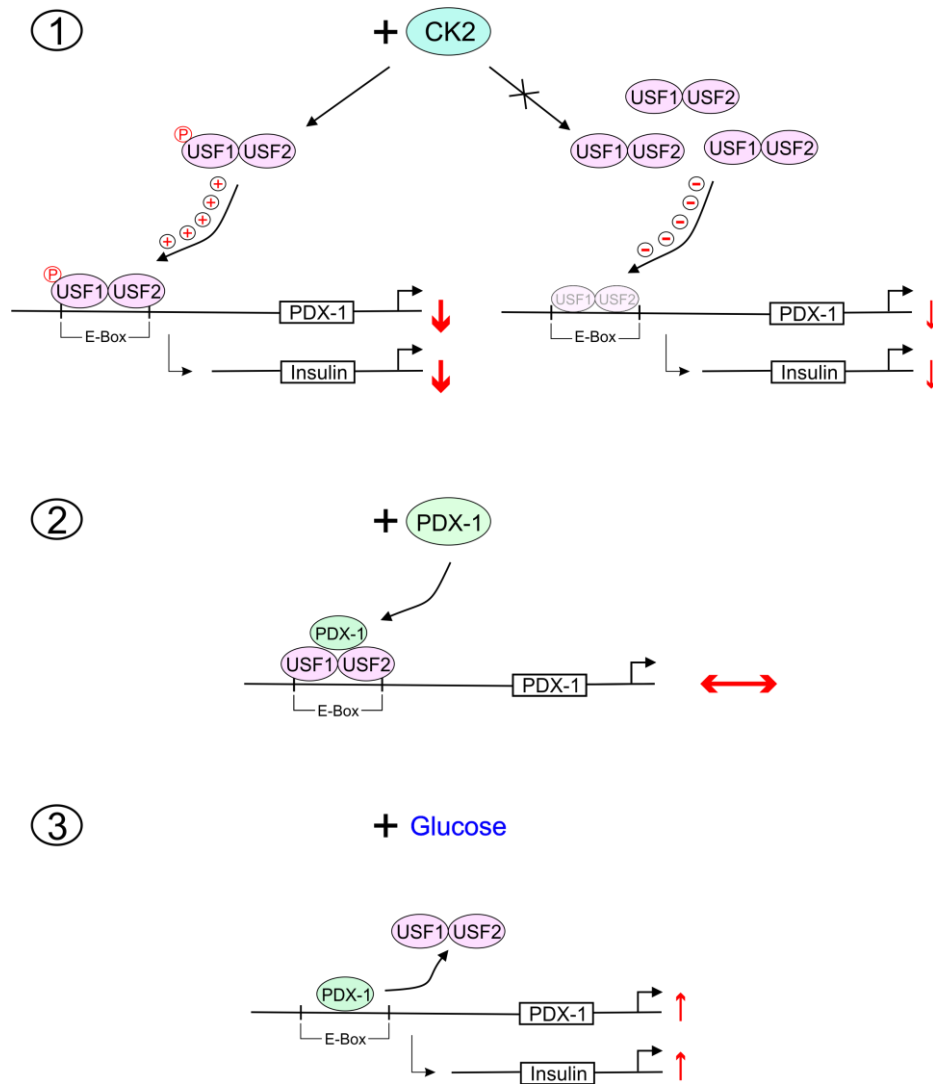


Abbildung 40: Schematische Darstellung der PDX-1- und Insulingenregulation durch die USFs, PDX-1 und durch die CK2 in den pankreatischen β-Zellen. (1) Die Proteinkinase CK2 phosphoryliert USF1, was dessen Bindung an den PDX-1 Promotor fördert und die Transkription der PDX-1- und Insulingene hemmt (linke Hälfte). Wird die CK2 gehemmt, bilden sich mehr USF1/USF2-Dimere, die schlechter an den PDX-1 Promotor binden. Dadurch wird die Transkription der PDX-1- und Insulingene weniger stark gehemmt (rechte Hälfte). (2) Transaktivierendes PDX-1 kann zusammen mit den USF-Proteinen an den PDX-1 Promotor binden, wodurch die reprimierende Wirkung der USFs auf die Transkription des PDX-1 Gens aufgehoben wird. (3) In Anwesenheit von Glucose wird die Bindung der USF-Proteine an den PDX-1 Promotor schlechter, während die Bindung von PDX-1 durch Glucose unbeeinflusst bleibt. Dadurch kann die Transkription der PDX-1- und Insulingene stimuliert werden.

Die USF-Proteine USF1 und USF2 gelten als wichtige Regulatoren zahlreicher Gene in vielfältigen, zellulären Stoffwechselwegen, und eine Dysregulation ihrer Expression oder Funktionen können die USF-abhängige Transkriptionen in erheblichem Umfang stören und bei der Entstehung von metabolischen Störungen wie diabetischen Nierenerkrankungen [240, 307] oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen [139, 229, 308] mitwirken. Auch genetische

Variationen in *USF2*, und vor allem auch in *USF1*, werden mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Erkrankungen wie Alzheimer [100, 110, 262], familiär kombinierter Hyperlipidämie (FCHL) [42, 140, 206, 265], Arteriosklerose [135, 138] oder Diabetes mellitus [103, 174] assoziiert. Besonders in Bezug auf die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 haben einige Arbeitsgruppen genetische Veränderungen von *USF1* verantwortlich gemacht [174, 198], während andere Gruppen keine Bezüge zu *USF1* nachweisen können [74, 324]. Daher ist es von großem Interesse, mehr über die Regulation USF-abhängiger Genexpressionen beim Erhalt der zellulären Glucosehomöostase und der Glucose-induzierten Transkription des Insulingens in den pankreatischen β -Zellen zu verstehen. Dabei ist es wichtig, weitere Faktoren zu identifizieren, die diese Regulation synergistisch oder antagonistisch mit den USFs beeinflussen, wie dies z.B. in der vorliegenden Arbeit für CK2 und PDX-1 gezeigt werden konnte. Auch durch andere Arbeitsgruppen konnten für die CK2 bisher schon negative Einflüsse auf die Insulinsekretion in β -Zellen nachgewiesen werden [183, 234], während PDX-1 schon lange als eines der am besten untersuchten Beispiele für Schlüsselregulatoren in der β -Zelle gilt [12, 210, 257], was es zu einem attraktiven Ziel für die Therapie von β -Zell-Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, macht.

Die bisherigen Befunde über die Interaktion der USF-Proteine mit CK2 in den pankreatischen β -Zellen zeigen eine deutliche Glucose-Abhängigkeit, vor allem bei der Transkription der PDX-1- und Insulingene, durch USF1 und CK2. Dennoch sollten eine Reihe weiterer Fragen diesbezüglich noch geklärt werden. In weiteren Untersuchungen sollte vor allem die Spezifität der PDX-1 Transrepression durch USF1 weiter geklärt werden und seine Interaktion mit weiteren Cofaktoren der PDX-1 Transkription, wie PDX-1, MafA, NeuroD1/ β 2 oder E47/HNF-1 α genauer analysiert werden. Neben einem Glucose-Einfluss sollte auch die Phosphorylierung von USF1 durch die CK2 bezüglich Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen am PDX-1 Promotor mit den Cofaktoren geklärt werden. Außerdem wäre es wichtig zu erforschen, in wie weit die CK2-Phosphorylierung von USF1 einen Einfluss auf die DNA-Bindung der USFs am Insulinpromotor, und deren Interaktion dort mit weiteren Cofaktoren bezüglich der Transkription und Sekretion von Insulin in den pankreatischen β -Zellen hat. Nach detaillierter Charakterisierung der Glucose-abhängigen Interaktion von USF1 und CK2 bei Genexpressionen auf Zellkulturebene, ist es danach erforderlich, die erhaltenen Ergebnisse auf ihre biologische Bedeutung im lebenden Organismus zu überprüfen. Neue Erkenntnisse zur Aufklärung der Regulation der zellulären Glucosehomöostase in den pankreatischen β -Zellen sind so essentiell für die Identifikation neuer Therapiemethoden zur Behandlung von Diabetes mellitus oder anderer β -Zell-Dysfunktionen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] http://www.neb.Com/Nebecomm/Products_Intl/ProductM0530.Asp, 2012.
- [2] Molecularstation. PhosphorImaging <http://www.Molecularstation.Com/Molecular-Biology-Techniques/Phosphorimaging>, 2012.
- [3] New England BioLabs Inc. Phusion High Fidelity DNA Polymerase http://www.Neb.Com/Nebecomm/Products_Intl/ProductM0530.Asp, 2012.
- [4] K.A. Ahmad, G. Wang, J. Slaton, G. Unger, K. Ahmed, Targeting CK2 for cancer therapy, *Anticancer Drugs* 16 (2005) pp. 1037-1043.
- [5] R.A. Ajjan and K.R. Owen, Glucokinase MODY and implications for treatment goals of common forms of diabetes, *Curr. Diab. Rep.* 14 (2014) p.559.
- [6] F. Al-Quobaili and M. Montenarh, Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2, *Int. J. Mol. Med.* 21 (2008) pp. 399-404.
- [7] F. Al-Quobaili and M. Montenarh, CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism, *Metabolism* 61 (2012) pp. 1512-1517.
- [8] C.P. Alvarado-Diaz, J.C. Tapia, M. Antonelli, R.D. Moreno, Differential localization of alpha' and beta subunits of protein kinase CK2 during rat spermatogenesis, *Cell Tissue Res.* (2009) pp. 139-149.
- [9] M. Amemiya-Kudo, J. Oka, Y. Takeuchi, H. Okazaki, T. Yamamoto, N. Yahagi, K. Matsuzaka, S. Okazaki, J. Osuga, N. Yamada, T. Murase, H. Shimano, Suppression of the pancreatic duodenal homeodomain transcription factor-1 (Pdx-1) promoter by sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), *J. Biol. Chem.* 286 (2011) pp. 27902-27914.
- [10] E. Ampofo, T. Sokolowsky, C. Götz, M. Montenarh, Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1833 (2013) pp. 439-451.

- [11] C.W. Anderson and S.P. Lees-Miller, The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK, *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2 (1992) pp. 283-314.
- [12] S.S. Andrali, M.L. Sampley, N.L. Vanderford, S. Ozcan, Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells, *Biochem. J.* 415 (2008) pp. 1-10.
- [13] G.K. Andrews, D.K. Lee, R. Ravindra, P. Lichtlen, M. Sirito, M. Sawadogo, W. Schaffner, The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development, *EMBO J.* 20 (2001) pp. 1114-1122.
- [14] A. Anik, G. Catli, A. Abaci, E. Bober, Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 28 (2015) pp. 251-263.
- [15] S.A. Armstrong, D.A. Barry, R.W. Leggett, C.R. Mueller, Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of spl decreases its DNA binding activity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 13489-13495.
- [16] M. Asfari, D. Janjic, P. Meda, G. Li, P.A. Halban, C.B. Wollheim, Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines, *Endocrinology* 130 (1992) pp. 167-178.
- [17] S.J. Ashcroft, The control of insulin release by sugars, *Ciba Found. Symp.* 41 (1976) pp. 117-139.
- [18] S. Ashizawa, F.C. Brunicardi, X.P. Wang, PDX-1 and the pancreas, *Pancreas* 28 (2004) pp. 109-120.
- [19] W.R. Atchley and W.M. Fitch, A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94 (1997) pp. 5172-5176.
- [20] D.E. Ayer, L. Kretzner, R.N. Eisenman, Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity, *Cell* 72 (1993) pp. 211-222.
- [21] A.J. Bannister and E.A. Miska, Regulation of gene expression by transcription factor acetylation, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) pp. 1184-1192.

- [22] Y. Baron, S. Corre, N. Mouchet, S. Vaulont, S. Prince, M.D. Galibert, USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-induced DNA photolesions, *PLoS. Genet.* 8 (2012) p.e1002470.
- [23] J. Barrow, C.W. Hay, L.A. Ferguson, H.M. Docherty, K. Docherty, Transcription factor cycling on the insulin promoter, *FEBS Lett.* 580 (2006) pp. 711-715.
- [24] R. Battistutta, G. Cozza, F. Pierre, E. Papinutto, G. Lolli, S. Sarno, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, M. Haddach, K. Anderes, D.M. Ryckman, F. Meggio, L.A. Pinna, Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer, *Biochemistry* 50 (2011) pp. 8478-8488.
- [25] A.D. Baxevanis and C.R. Vinson, Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 (1993) pp. 278-285.
- [26] E. Ben-Shushan, S. Marshak, M. Shoshkes, E. Cerasi, D. Melloul, A pancreatic beta - cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) pp. 17533-17540.
- [27] E.M. Blackwood and R.N. Eisenman, Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc, *Science* 251 (1991) pp. 1211-1217.
- [28] T. Boonsaen, P. Rojvirat, K.H. Surinya, J.C. Wallace, S. Jitrapakdee, Transcriptional regulation of the distal promoter of the rat pyruvate carboxylase gene by hepatocyte nuclear factor 3beta/Foxa2 and upstream stimulatory factors in insulinoma cells, *Biochem. J.* 405 (2007) pp. 359-367.
- [29] M.J. Boucher, L. Selander, L. Carlsson, H. Edlund, Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) pp. 6395-6403.
- [30] J. Brunstedt and S.J. Chan, Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106 (1982) pp. 1383-1389.

- [31] T. Buchou and C. Cochet, [Protein kinase CK2: an enzyme that likes to be different], *Med. Sci. (Paris)* 19 (2003) pp. 709-716.
- [32] C.V. Burke, C.W. Buettger, E.A. Davis, S.J. McClane, F.M. Matschinsky, S.E. Raper, Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI), *Biochem. J.* 342 (1999) pp. 345-352.
- [33] R.W. Carthew, L.A. Chodosh, P.A. Sharp, An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter, *Cell* 43 (1985) pp. 439-448.
- [34] M. Casado, V.S. Vallet, A. Kahn, S. Vaulont, Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 2009-2013.
- [35] E. Cerasi, Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: some re-evaluations and proposals, *Diabetologia* 11 (1975) pp. 1-13.
- [36] F. Chaverneff and J. Barrett, Casein kinase II contributes to the synergistic effects of BMP7 and BDNF on Smad 1/5/8 phosphorylation in septal neurons under hypoglycemic stress, *J. Neurochem.* 109 (2009) pp. 733-743.
- [37] M.Z. Chen, D.X. Li, E.G. Krebs, J.A. Cooper, The casein kinase II β subunit binds to Mos and inhibits Mos activity, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) pp. 1904-1912.
- [38] N. Chen, M.N. Szentirmay, S.A. Pawar, M. Sirito, J. Wang, Z. Wang, Q. Zhai, H.X. Yang, D.M. Peehl, J.L. Ware, M. Sawadogo, Tumor-suppression function of transcription factor USF2 in prostate carcinogenesis, *Oncogene* 25 (2006) pp. 579-587.
- [39] E. Cheung, P. Mayr, F. Coda-Zabetta, P.G. Woodman, D.S. Boam, DNA-binding activity of the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1) is regulated by cyclin-dependent phosphorylation, *Biochem. J.* 344 (1999) pp. 145-152.

- [40] W.L. Chick, S. Warren, R.N. Chute, A.A. Like, V. Lauris, K.C. Kitchen, A transplantable insulinoma in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74 (1977) pp. 628-632.
- [41] R. Ciarapica, J. Rosati, G. Cesareni, S. Nasi, Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix-leucine zipper domains. Design of repertoires and selection of high affinity ligands for natural proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 12182-12190.
- [42] H. Coon, Y. Xin, P.N. Hopkins, R.M. Cawthon, S.J. Hasstedt, S.C. Hunt, Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides, *Hum. Genet.* 117 (2005) pp. 444-451.
- [43] S. Corre and M.D. Galibert, Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors, *Pigment Cell Res.* 18 (2005) pp. 337-348.
- [44] S. Corre, A. Primot, E. Sviderskaya, D.C. Bennett, S. Vaulont, C.R. Goding, M.D. Galibert, UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1), *J. Biol. Chem.* 279 (2004) pp. 51226-51233.
- [45] G. Cozza, M. Mazzorana, E. Papinutto, J. Bain, M. Elliott, M.G. Di, A. Gianoncelli, M.A. Pagano, S. Sarno, M. Ruzzene, R. Battistutta, F. Meggio, S. Moro, G. Zagotto, L.A. Pinna, Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2, *Biochem. J.* 421 (2009) pp. 387-395.
- [46] G. Cozza, A. Venerando, S. Sarno, L.A. Pinna, The selectivity of CK2 inhibitor quinalizarin: A reevaluation, *BioMed Research International* ID734127, im Druck (2015).
- [47] M.H. Cuif, M. Cognet, D. Boquet, G. Tremp, A. Kahn, S. Vaulont, Elements responsible for hormonal control and tissue specificity of L-type pyruvate kinase gene expression in transgenic mice, *Mol. Cell Biol.* 12 (1992) pp. 4852-4861.
- [48] G. da Silva Xavier, G.A. Rutter, F. Diraison, C. Andreolas, I. Leclerc, ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells, *J. Lipid Res.* 47 (2006) pp. 2482-2491.

- [49] G. da Silva Xavier, J. Rutter, G.A. Rutter, Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 (2004) pp. 8319-8324.
- [50] A.A. DePaoli-Roach, Z. Ahmad, P.J. Roach, Characterization of a rabbit skeletal muscle protein kinase (PC0.7) able to phosphorylate glycogen synthase and phosvitin, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) pp. 8955-8962.
- [51] J.M. Desterro, M.S. Rodriguez, R.T. Hay, Regulation of transcription factors by protein degradation, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) pp. 1207-1219.
- [52] M.J. Diaz Guerra, M.O. Bergot, A. Martinez, M.H. Cuif, A. Kahn, M. Raymondjean, Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) pp. 7725-7733.
- [53] E.Y. Dimova and T. Kietzmann, The MAPK pathway and HIF-1 are involved in the induction of the human PAI-1 gene expression by insulin in the human hepatoma cell line HepG2, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090 (2006) pp. 355-367.
- [54] H.M. Docherty, C.W. Hay, L.A. Ferguson, J. Barrow, E. Durward, K. Docherty, Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter, *Biochem. J.* 389 (2005) pp. 813-820.
- [55] K. Docherty and A.R. Clark, Nutrient regulation of insulin gene expression, *FASEB J.* 8 (1994) pp. 20-27.
- [56] H. Edlund, Developmental biology of the pancreas, *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001) p.S5-S9.
- [57] L.J. Elrick and K. Docherty, Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1, *Diabetes* 50 (2001) pp. 2244-2252.
- [58] M. Faust, M. Jung, J. Günther, R. Zimmermann, M. Montenarh, Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus, *Mol. Cell Biochem.* 227 (2001) pp. 73-80.
- [59] M. Faust and M. Montenarh, Subcellular localization of protein kinase CK2: A key to its function?, *Cell Tissue Res.* 301 (2000) pp. 329-340.

- [60] M. Faust, N. Schuster, M. Montenarh, Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin, *FEBS Letters* 462 (1999) pp. 51-56.
- [61] A. Fernandez-Perez and M. Vallejo, Pdx1 and USF transcription factors co-ordinately regulate Alx3 gene expression in pancreatic beta-cells, *Biochem. J.* 463 (2014) pp. 287-296.
- [62] O. Filhol, A. Nueda, V. Martel, D. Gerber-Scokaert, M.J. Benitez, C. Souchier, Y. Saoudi, C. Cochet, Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual Subunits, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) pp. 975-987.
- [63] F. Foufelle, B. Gouhot, J.P. Pegorier, D. Perdereau, J. Girard, P. Ferre, Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) pp. 20543-20546.
- [64] F. Foufelle, N. Lepetit, D. Bosc, N. Delzenne, J. Morin, M. Raymondjean, P. Ferre, DNase I hypersensitivity sites and nuclear protein binding on the fatty acid synthase gene: identification of an element with properties similar to known glucose-responsive elements, *Biochem. J.* 308 (1995) pp. 521-527.
- [65] C. Franchin, L. Cesaro, M. Salvi, R. Million, E. Iori, P. Cifani, P. James, G. Arrigoni, L. Pinna, Quantitative analysis of a phosphoproteome readily altered by the protein kinase CK2 inhibitor quinalizarin in HEK-293T cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1854 (2014) pp. 609-623.
- [66] S. Frenkel, G. Kay, H. Nechushtan, E. Razin, Nuclear translocation of upstream stimulating factor 2 (USF2) in activated mast cells: a possible role in their survival, *J. Immunol.* 161 (1998) pp. 2881-2887.
- [67] P. Froguel, M. Vaxillaire, F. Sun, G. Velho, H. Zouali, M.O. Butel, S. Lesage, N. Vionnet, K. Clement, F. Fougerousse, ., Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Nature* 356 (1992) pp. 162-164.
- [68] K.H. Gabbay, The insulinopathies, *N. Engl. J. Med.* 302 (1980) pp. 165-167.

- [69] M.D. Galibert, L. Boucontet, C.R. Goding, T. Meo, Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor, *J. Immunol.* 159 (1997) pp. 6176-6183.
- [70] M.D. Galibert, S. Carreira, C.R. Goding, The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression, *EMBO J.* 20 (2001) pp. 5022-5031.
- [71] Y. Gao, J. Miyazaki, G.W. Hart, The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 415 (2003) pp. 155-163.
- [72] Y. Ge, T.L. Jensen, L.H. Matherly, J.W. Taub, Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 49901-49910.
- [73] M.S. German, J. Wang, R.B. Chadwick, W.J. Rutter, Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex, *Genes Dev.* 6 (1992) pp. 2165-2176.
- [74] F. Gibson, S. Hercberg, P. Froguel, Common polymorphisms in the USF1 gene are not associated with type 2 diabetes in French Caucasians, *Diabetes* 54 (2005) pp. 3040-3042.
- [75] S.J. Giddings, J. Chirgwin, M.A. Permutt, Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo, *Diabetes* 31 (1982) pp. 624-629.
- [76] G. Gill, Something about SUMO inhibits transcription, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15 (2005) pp. 536-541.
- [77] J. Girard, P. Ferre, F. Foufelle, Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes, *Annu. Rev. Nutr.* 17 (1997) pp. 325-352.
- [78] D.A. Glauser, T. Brun, B.R. Gauthier, W. Schlegel, Transcriptional response of pancreatic beta cells to metabolic stimulation: large scale identification of

- immediate-early and secondary response genes, *BMC. Mol. Biol.* 8 (2007) p.54.
- [79] E. Glick, D. Leshkowitz, M.D. Walker, Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 2199-2204.
- [80] C. Götz, C. Bachmann, M. Montenarh, Inhibition of protein kinase CK2 leads to a modulation of androgen receptor dependent transcription in prostate cancer cells, *The Prostate* 67 (2007) pp. 125-134.
- [81] J. Grande, M. Perez, E. Itarte, Phosphorylation of hepatic insulin receptor by casein kinase 2, *FEBS Lett.* 232 (1988) pp. 130-134.
- [82] P.D. Gregor, M. Sawadogo, R.G. Roeder, The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer, *Genes Dev.* 4 (1990) pp. 1730-1740.
- [83] M.J. Griffin, R.H. Wong, N. Pandya, H.S. Sul, Direct interaction between USF and SREBP-1c mediates synergistic activation of the fatty-acid synthase promoter, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) pp. 5453-5467.
- [84] P.M. Groenen, E. Garcia, P. Debeer, K. Devriendt, J.P. Fryns, W.J. Van de Ven, Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia, *Genomics* 38 (1996) pp. 141-148.
- [85] B. Guerra and O.G. Issinger, Protein kinase CK2 in human diseases, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) pp. 1870-1886.
- [86] B. Guerra, O.G. Issinger, J.Y.J. Wang, Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory β -subunit of protein kinase CK2, *Oncogene* 22 (2003) pp. 4933-4942.
- [87] B. Guerra, S. Siemer, B. Boldyreff, O.G. Issinger, Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles, *FEBS Letters* 462 (1999) pp. 353-357.

- [88] Y. Guz, M.R. Montminy, R. Stein, J. Leonard, L.W. Gamer, C.V. Wright, G. Teitelman, Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny, *Development* 121 (1995) pp. 11-18.
- [89] A. Haga, Y. Niinaka, A. Raz, Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1480 (2000) pp. 235-244.
- [90] S.Y. Han, J.C. Kim, J.M. Suh, I.K. Chung, Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2, *FEBS Lett.* 505 (2001) pp. 57-62.
- [91] D. Hanahan, Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids., *J. Mol. Biol.* 166 (1983) pp. 557-580.
- [92] D.E. Hanna, A. Rethinaswamy, C.V.C. Glover, Casein kinase II is required for cell cycle progression during G₁ and G₂/M in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) pp. 25905-25914.
- [93] J.S. Harmon, C.E. Gleason, Y. Tanaka, E.A. Oseid, K.K. Hunter-Berger, R.P. Robertson, In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1995-2000.
- [94] G.M. Hathaway and J.A. Traugh, Casein Kinases - Multipotential Protein Kinases, *Curr. Topics Cell Reg.* 21 (1982) pp. 101-127.
- [95] A.T. Hattersley, R.C. Turner, M.A. Permutt, P. Patel, Y. Tanizawa, K.C. Chiu, S. O'Rahilly, P.J. Watkins, J.S. Wainscoat, Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene, *Lancet* 339 (1992) pp. 1307-1310.
- [96] C.W. Hay and K. Docherty, Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research, *Diabetes* 55 (2006) pp. 3201-3213.
- [97] D.J. Hayzer and P.B. Iynedjian, Alternative splicing of glucokinase mRNA in rat liver, *Biochem. J.* 270 (1990) pp. 261-263.

- [98] A.A. Henrion, A. Martinez, M.G. Mattei, A. Kahn, M. Raymondjean, Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse, *Genomics* 25 (1995) pp. 36-43.
- [99] A.A. Henrion, S. Vaulont, M. Raymondjean, A. Kahn, Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family, *Mamm. Genome* 7 (1996) pp. 803-809.
- [100] P.J. Higgins, The TGF-beta1/upstream stimulatory factor-regulated PAI-1 gene: potential involvement and a therapeutic target in Alzheimer's disease, *J. Biomed. Biotechnol.* 2006 (2006) p.15792.
- [101] G.A. Hitman and J. Sudagani, Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome, *Int. J. Clin. Pract. Suppl* (2004) pp. 3-8.
- [102] T.D. Hock, H.S. Nick, A. Agarwal, Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2, bind to the human haem oxygenase-1 proximal promoter in vivo and regulate its transcription, *Biochem. J.* 383 (2004) pp. 209-218.
- [103] C. Holzapfel, J. Baumert, H. Grallert, A.M. Muller, B. Thorand, N. Khuseyinova, C. Herder, C. Meisinger, H. Hauner, H.E. Wichmann, W. Koenig, T. Illig, N. Klopp, Genetic variants in the USF1 gene are associated with low-density lipoprotein cholesterol levels and incident type 2 diabetes mellitus in women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002, *Eur. J. Endocrinol.* 159 (2008) pp. 407-416.
- [104] A. Hoorens, M. Van de Casteele, G. Kloppel, D. Pipeleers, Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program, *J. Clin. Invest* 98 (1996) pp. 1568-1574.
- [105] T.K. Howcroft, C. Murphy, J.D. Weissman, S.J. Huber, M. Sawadogo, D.S. Singer, Upstream stimulatory factor regulates major histocompatibility complex class I gene expression: the U2DeltaE4 splice variant abrogates E-box activity, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) pp. 4788-4797.

- [106] Y.H. Huang, C.C. Huang, J.H. Chuang, C.S. Hsieh, S.Y. Lee, C.L. Chen, Upstream stimulatory factor 2 is implicated in the progression of biliary atresia by regulation of hepcidin expression, *J. Pediatr. Surg.* 43 (2008) pp. 2016-2023.
- [107] H. Hui and R. Perfetti, Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002) pp. 129-141.
- [108] P. Hydbring and L.G. Larsson, Tipping the balance: Cdk2 enables Myc to suppress senescence, *Cancer Res.* 70 (2010) pp. 6687-6691.
- [109] P.M. Ismail, T. Lu, M. Sawadogo, Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines, *Oncogene* 18 (1999) pp. 5582-5591.
- [110] K. Isotalo, E.H. Kok, T.M. Luoto, S. Haikonen, H. Haapasalo, T. Lehtimäki, P.J. Karhunen, Upstream transcription factor 1 (USF1) polymorphisms associate with Alzheimer's disease-related neuropathological lesions: Tampere Autopsy Study, *Brain Pathol.* 22 (2012) pp. 765-775.
- [111] N. Itoh and H. Okamoto, Translational control of proinsulin synthesis by glucose, *Nature* 283 (1980) pp. 100-102.
- [112] P.B. Iynedjian, Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene, *Biochem. J.* 333 (1998) pp. 705-712.
- [113] P.B. Iynedjian, G. Mobius, H.J. Seitz, C.B. Wollheim, A.E. Renold, Tissue-specific expression of glucokinase: identification of the gene product in liver and pancreatic islets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83 (1986) pp. 1998-2001.
- [114] P.B. Iynedjian, P.R. Pilot, T. Nospikel, J.L. Milburn, C. Quaade, S. Hughes, C. Ucla, C.B. Newgard, Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86 (1989) pp. 7838-7842.
- [115] S.P. Jackson, Regulating transcription factor activity by phosphorylation, *Trends Cell Biol.* 2 (1992) pp. 104-108.

- [116] A.S. Jaiswal and S. Narayan, Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene, *J. Cell Biochem.* 81 (2001) pp. 262-277.
- [117] M. Janeczko, M. Maslyk, R. Szyszka, A. Baier, Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors, *Mol. Cell Biochem.* 356(1-2) (2011) pp. 121-126.
- [118] T.L. Jetton, Y. Liang, C.C. Pettepher, E.C. Zimmerman, F.G. Cox, K. Horvath, F.M. Matschinsky, M.A. Magnuson, Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) pp. 3641-3654.
- [119] B. Jiang and C.R. Mendelson, O₂ enhancement of human trophoblast differentiation and hCYP19 (aromatase) gene expression are mediated by proteasomal degradation of USF1 and USF2, *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) pp. 8824-8833.
- [120] S.E. Johnson, X. Wang, S. Hardy, E.J. Taparowsky, S.F. Konieczny, Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation, *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) pp. 1604-1613.
- [121] J.C. Jonas, A. Sharma, W. Hasenkamp, H. Ilkova, G. Patane, R. Laybutt, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 14112-14121.
- [122] K. Josefsen, L.R. Sorensen, K. Buschard, M. Birkenbach, Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 42 (1999) pp. 195-203.
- [123] A. Kahn, Transcriptional regulation by glucose in the liver, *Biochimie* 79 (1997) pp. 113-118.
- [124] M. Kalathur, A. Toso, J. Chen, A. Revandkar, C. Danzer-Baltzer, I. Guccini, A. Alajati, M. Sarti, S. Pinton, L. Brambilla, M.D. Di, G. Carbone, R. Garcia-Escudero, A. Padova, L. Magnoni, A. Tarditi, L. Maccari, F. Malusa, R.K. Kalathur, A. Pinna, G. Cozza, M. Ruzzene, N. Delaleu, C.V. Catapano, I.J.

- Frew, A. Alimonti, A chemogenomic screening identifies CK2 as a target for pro-senescence therapy in PTEN-deficient tumours, *Nat. Commun.* 6 (2015) p.7227.
- [125] H. Kaneto and T.A. Matsuoka, Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature beta-cell function, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) pp. 6281-6297.
- [126] O. Karlsson, T. Edlund, J.B. Moss, W.J. Rutter, M.D. Walker, A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84 (1987) pp. 8819-8823.
- [127] E.N. Kaytor, J. Qian, H.C. Towle, L.K. Olson, An indirect role for upstream stimulatory factor in glucose-mediated induction of pyruvate kinase and S14 gene expression, *Mol. Cell Biochem.* 210 (2000) pp. 13-21.
- [128] H.J. Kennedy, B. Viollet, I. Rafiq, A. Kahn, G.A. Rutter, Upstream stimulatory factor-2 (USF2) activity is required for glucose stimulation of L-pyruvate kinase promoter activity in single living islet beta-cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 20636-20640.
- [129] H. Kim, K. Choi, H. Kang, S.Y. Lee, S.W. Chi, M.S. Lee, J. Song, D. Im, Y. Choi, S. Cho, Identification of a Novel Function of CX-4945 as a Splicing Regulator, *PLoS. ONE.* 9 (2014) p.e94978.
- [130] S.J. Kim and C.R. Kahn, Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression, *Biochem. J.* 323 (Pt 3) (1997) pp. 621-627.
- [131] D.M. Kipnis and M.A. Permutt, Inductive effects of glucose on the insulin secretory and synthetic apparatus of the pancreatic -cell, *Isr. J. Med. Sci.* 8 (1972) pp. 224-232.
- [132] B.J. Kirschbaum, P. Pognonec, R.G. Roeder, Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF, *Mol. Cell Biol.* 12 (1992) pp. 5094-5101.

- [133] S. Klein, Dissertation; "Die Interaktion von PDX-1 und CK2 unter dem Einfluss von Glucose in den β -Zellen des Pankreas", 2014.
- [134] W. Krek, G. Maridor, E.A. Nigg, Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme, *J. Cell Biol.* 116 (1992) pp. 43-55.
- [135] K. Kristiansson, E. Ilveskoski, T. Lehtimäki, L. Peltonen, M. Perola, P.J. Karhunen, Association analysis of allelic variants of USF1 in coronary atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) pp. 983-989.
- [136] A. Krones, K. Jungermann, T. Kietzmann, Cross-talk between the signals hypoxia and glucose at the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, *Endocrinology* 142 (2001) pp. 2707-2718.
- [137] E. Landesman-Bollag, A. Belkina, B. Hovey, E. Connors, C. Cox, D.C. Seldin, Developmental and growth defects in mice with combined deficiency of CK2 catalytic genes, *Mol. Cell Biochem.* 356 (2011) pp. 227-231.
- [138] P.P. Laurila, J. Naukkarinen, K. Kristiansson, S. Ripatti, T. Kauttu, K. Silander, V. Salomaa, M. Perola, P.J. Karhunen, P.J. Barter, C. Ehnholm, L. Peltonen, Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) pp. 346-352.
- [139] P.P. Laurila, J. Soronen, S. Kooijman, S. Forsstrom, M.R. Boon, I. Surakka, E. Kaiharju, C.P. Coomans, S.A. Van Den Berg, A. Autio, A.P. Sarin, J. Kettunen, E. Tikkanen, T. Manninen, J. Metso, R. Silvennoinen, K. Merikanto, M. Ruuth, J. Perttilä, A. Makela, A. Isomi, A.M. Tuomainen, A. Tikka, U.A. Ramadan, I. Seppala, T. Lehtimäki, J. Eriksson, A. Havulinna, A. Jula, P.J. Karhunen, V. Salomaa, M. Perola, C. Ehnholm, M. Lee-Rueckert, E.M. Van, A. Roivainen, M.R. Taskinen, L. Peltonen, E. Mervaala, A. Jalanko, E. Hohtola, V.M. Olkkonen, S. Ripatti, P.T. Kovanen, P.C. Rensen, A. Suomalainen, M. Jauhiainen, USF1 deficiency activates brown adipose tissue and improves cardiometabolic health, *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) p.323ra13.
- [140] J.C. Lee, A.J. Lusis, P. Pajukanta, Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond, *Curr. Opin. Lipidol.* 17 (2006) pp. 101-109.

- [141] A.M. Lefrancois-Martinez, A. Martinez, B. Antoine, M. Raymondjean, A. Kahn, Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) pp. 2640-2643.
- [142] S. Lenzen, A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) pp. 12189-12194.
- [143] J. Leonard, B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, M.R. Montminy, Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) pp. 1275-1283.
- [144] Q. Lin, X. Luo, M. Sawadogo, Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) pp. 23894-23903.
- [145] D.W. Litchfield, Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death, *Biochem. J.* 369 (2003) pp. 1-15.
- [146] D.W. Litchfield and B. Lüscher, Casein kinase II in signal transduction and cell regulation., *Mol. Cell. Biochem.* 127/128 (1993) pp. 187-199.
- [147] M. Liu, J.R. Whetstine, S.G. Payton, Y. Ge, R.M. Flatley, L.H. Matherly, Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter, *Biochem. J.* 383 (2004) pp. 249-257.
- [148] J.I. Loizou, S.F. El-Khamisy, A. Zlatanou, D.J. Moore, D.W. Chan, J. Qin, S. Sarno, F. Meggio, L.A. Pinna, K.W. Caldecott, The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks, *Cell* 117 (2004) pp. 17-28.
- [149] G. Lolli, L.A. Pinna, R. Battistutta, Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) pp. 1158-1163.
- [150] G. Lolli, A. Ranchio, R. Battistutta, Active Form of the Protein Kinase CK2 alphabeta Holoenzyme Is a Strong Complex with Symmetric Architecture, *ACS Chem. Biol.* 9 (2013) pp. 366-371.

- [151] D.Q. Lou, M. Tannour, L. Selig, D. Thomas, A. Kahn, M. Vasseur-Cognet, Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 28385-28394.
- [152] D.Y. Lou, I. Dominguez, P. Toselli, E. Landesman-Bollag, C. O'Brien, D.C. Seldin, The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) pp. 131-139.
- [153] X. Luo and M. Sawadogo, Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (1996) pp. 1308-1313.
- [154] X. Luo and M. Sawadogo, Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains, *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) pp. 1367-1375.
- [155] S. Lupp, C. Götz, S. Khadouma, T. Horbach, E.Y. Dimova, A.-M. Bohrer, T. Kietzmann, M. Montenarh, The upstream stimulatory factor USF1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation, *Cell Signal.* 26 (2014) pp. 2809-2817.
- [156] B. Lüscher and D.W. Litchfield, Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines., *Eur. J. Biochem.* 220 (1994) pp. 521-526.
- [157] W.M. Macfarlane, C.M. McKinnon, Z.A. Felton-Edkins, H. Cragg, R.F. James, K. Docherty, Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 1011-1016.
- [158] W.M. Macfarlane, M.L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, K. Docherty, Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner, *Biochem. J.* 303 (1994) pp. 625-631.
- [159] R. Maeda, I. Raz, F. Zurlo, J. Sommercorn, Activation of skeletal muscle casein kinase II by insulin is not diminished in subjects with insulin resistance, *J. Clin. Invest* 87 (1991) pp. 1017-1022.

- [160] T. Maekawa, T. Sudo, M. Kurimoto, S. Ishii, USF-related transcription factor, HIV-TF1, stimulates transcription of human immunodeficiency virus-1, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) pp. 4689-4694.
- [161] M.A. Magnuson, Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies, *Diabetes* 39 (1990) pp. 523-527.
- [162] M.A. Magnuson, Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression, *J. Cell Biochem.* 48 (1992) pp. 115-121.
- [163] M.A. Magnuson, T.L. Andreone, R.L. Printz, S. Koch, D.K. Granner, Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86 (1989) pp. 4838-4842.
- [164] M.A. Magnuson and K.D. Shelton, An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) pp. 15936-15942.
- [165] S. Marie, M.J. Diaz-Guerra, L. Miquerol, A. Kahn, P.B. Iynedjian, The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic beta-cell type, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) pp. 23881-23890.
- [166] O. Marin, F. Meggio, J.W. Perich, L.A. Pinna, Phosphotyrosine specifies the phosphorylation by protein kinase CK2 of a peptide reproducing the activation loop of the insulin receptor protein tyrosine kinase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) pp. 999-1005.
- [167] D.R. Marshak and D. Carroll, Synthetic peptide substrates for casein kinase II, *Methods Enzymol.* 200 (1991) pp. 134-156.
- [168] S. Marshak, E. Benshushan, M. Shoshkes, L. Havin, E. Cerasi, D. Melloul, Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) pp. 7583-7590.
- [169] L.R. Martins, P. Lucio, A. Melao, I. Antunes, B.A. Cardoso, R. Stansfield, M.T. Bertilaccio, P. Ghia, D. Drygin, M.G. Silva, J.T. Barata, Activity of the

- clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia* 28 (2014) pp. 179-182.
- [170] F.M. Matschinsky, Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes, *Diabetes* 39 (1990) pp. 647-652.
- [171] T. Matsuda, T. Noguchi, K. Yamada, M. Takenaka, T. Tanaka, Regulation of the gene expression of glucokinase and L-type pyruvate kinase in primary cultures of rat hepatocytes by hormones and carbohydrates, *J. Biochem.* 108 (1990) pp. 778-784.
- [172] T. Matsukawa, Y. Inoue, Y. Oishi, H. Kato, T. Noguchi, Up-regulation of upstream stimulatory factors by protein malnutrition and its possible role in regulation of the IGF-binding protein-1 gene, *Endocrinology* 142 (2001) pp. 4643-4651.
- [173] C.M. McKinnon and K. Docherty, Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function, *Diabetologia* 44 (2001) pp. 1203-1214.
- [174] S.J. Meex, J.V. van Vliet-Ostaptchouk, C.J. van der Kallen, M.M. van Greevenbroek, C.G. Schalkwijk, E.J. Feskens, E.E. Blaak, C. Wijmenga, M.H. Hofker, C.D. Stehouwer, T.W. de Bruin, Upstream transcription factor 1 (USF1) in risk of type 2 diabetes: association study in 2000 Dutch Caucasians, *Mol. Genet. Metab* 94 (2008) pp. 352-355.
- [175] F. Meggio and L.A. Pinna, One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?, *The FASEB Journal* 17 (2003) pp. 349-368.
- [176] M.D. Meglasson, P.T. Burch, D.K. Berner, H. Najafi, A.P. Vogin, F.M. Matschinsky, Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80 (1983) pp. 85-89.
- [177] M.D. Meglasson and F.M. Matschinsky, New perspectives on pancreatic islet glucokinase, *Am. J. Physiol* 246 (1984) pp. E1-13.
- [178] M.D. Meglasson and F.M. Matschinsky, Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion, *Diabetes Metab Rev.* 2 (1986) pp. 163-214.

- [179] D. Melloul, S. Marshak, E. Cerasi, Regulation of insulin gene transcription, *Diabetologia* 45 (2002) pp. 309-326.
- [180] D. Melloul, S. Marshak, E. Cerasi, Regulation of pdx-1 gene expression, *Diabetes* 51 Suppl 3 (2002) p.S320-S325.
- [181] D. Melloul, A. Tsur, D. Zangen, Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX-1) in health and disease, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 15 (2002) pp. 1461-1472.
- [182] R. Meng, Dissertation "Crosstalk between Protein Kinase CK2 and the transcription factor Pdx-1", 2010.
- [183] R. Meng, F. Al-Quobaili, I. Müller, C. Götz, G. Thiel, M. Montenarh, CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity, *Cell Mol. Life Sci.* 67 (2010) pp. 2481-2489.
- [184] C.P. Miller, R.E. McGehee, Jr., J.F. Habener, IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene, *EMBO J.* 13 (1994) pp. 1145-1156.
- [185] S.P. Miller, G.R. Anand, E.J. Karschnia, G.I. Bell, D.C. LaPorte, A.J. Lange, Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1645-1651.
- [186] D. Mitanhez, B. Doiron, R. Chen, A. Kahn, Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes, *Endocr. Rev.* 18 (1997) pp. 520-540.
- [187] J.M. Moates, S. Nanda, M.A. Cissell, M.J. Tsai, R. Stein, BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells, *Diabetes* 52 (2003) pp. 403-408.
- [188] M. Mollapour, S. Tsutsumi, Y.S. Kim, J. Trepel, L. Neckers, Casein kinase 2 phosphorylation of Hsp90 threonine 22 modulates chaperone function and drug sensitivity, *Oncotarget.* 2 (2011) pp. 407-417.
- [189] V. Moncollin, N.G. Miyamoto, X.M. Zheng, J.M. Egly, Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter, *EMBO J.* 5 (1986) pp. 2577-2584.

- [190] M. Montenarh, Cellular regulators of protein kinase CK2, *Cell Tissue Res.* 342 (2010) pp. 139-146.
- [191] M. Montenarh, Protein kinase CK2 and angiogenesis, *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 23 (2014) pp. 153-158.
- [192] A.L. Mosley, J.A. Corbett, S. Ozcan, Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) pp. 2279-2290.
- [193] A.L. Mosley and S. Ozcan, The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) pp. 54241-54247.
- [194] U. Münstermann, G. Fritz, G. Seitz, L. Yiping, H.R. Schneider, O.-G. Issinger, Casein kinase II is elevated in human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue., *Eur. J. Biochem.* 189 (1990) pp. 251-257.
- [195] C. Murre, P.S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L.Y. Jan, Y.N. Jan, C.V. Cabrera, J.N. Buskin, S.D. Hauschka, A.B. Lassar, ., Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence, *Cell* 58 (1989) pp. 537-544.
- [196] J. Naukkarinen, M. Gentile, A. Soro-Paavonen, J. Saarela, H.A. Koistinen, P. Pajukanta, M.R. Taskinen, L. Peltonen, USF1 and dyslipidemias: converging evidence for a functional intronic variant, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) pp. 2595-2605.
- [197] F.J. Naya, C.M. Stellrecht, M.J. Tsai, Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor, *Genes Dev.* 9 (1995) pp. 1009-1019.
- [198] M.C. Ng, K. Miyake, W.Y. So, E.W. Poon, V.K. Lam, J.K. Li, N.J. Cox, G.I. Bell, J.C. Chan, The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population, *Diabetologia* 48 (2005) pp. 2018-2024.

- [199] D.A. Nielsen, M. Welsh, M.J. Casadaban, D.F. Steiner, Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) pp. 13585-13589.
- [200] M. Nowak, A. Helleboid-Chapman, H. Jakel, E. Moitrot, C. Rommens, L.A. Pennacchio, J. Fruchart-Najib, J.C. Fruchart, Glucose regulates the expression of the apolipoprotein A5 gene, *J. Mol. Biol.* 380 (2008) pp. 789-798.
- [201] H. Ohlsson, O. Karlsson, T. Edlund, A beta-cell-specific protein binds to the two major regulatory sequences of the insulin gene enhancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85 (1988) pp. 4228-4231.
- [202] N.C. Olave, M.H. Grenett, M. Cadeiras, H.E. Grenett, P.J. Higgins, Upstream stimulatory factor-2 mediates quercetin-induced suppression of PAI-1 gene expression in human endothelial cells, *J. Cell Biochem.* 111 (2010) pp. 720-726.
- [203] J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnäd, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann, Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, *Cell* 127 (2006) pp. 635-648.
- [204] N.R. Pace, The universal nature of biochemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2001) pp. 805-808.
- [205] M.A. Pagano, J. Bain, Z. Kazimierczuk, S. Sarno, M. Ruzzene, G. Di Maira, M. Elliott, A. Orzeszko, G. Cozza, F. Meggio, L.A. Pinna, The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2. An update, *Biochem. J.* 415 (2008) pp. 353-365.
- [206] P. Pajukanta, H.E. Lilja, J.S. Sinsheimer, R.M. Cantor, A.J. Lusis, M. Gentile, X.J. Duan, A. Soro-Paavonen, J. Naukkarinen, J. Saarela, M. Laakso, C. Ehnholm, M.R. Taskinen, L. Peltonen, Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1), *Nat. Genet.* 36 (2004) pp. 371-376.

- [207] C.W. Park and M.D. Walker, Subunit structure of cell-specific E box-binding proteins analyzed by quantitation of electrophoretic mobility shift, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) pp. 15642-15649.
- [208] J.H. Park, D.A. Stoffers, R.D. Nicholls, R.A. Simmons, Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1, *J. Clin. Invest* 118 (2008) pp. 2316-2324.
- [209] J.L. Parsons, I.I. Dianova, D. Finch, P.S. Tait, C.E. Strom, T. Helleday, G.L. Dianov, XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) pp. 835-841.
- [210] F. Pedica, S. Beccari, S. Pedron, L. Montagna, P. Piccoli, C. Doglioni, M. Chilosi, PDX-1 (pancreatic/duodenal homeobox-1 protein 1), *Pathologica* 106 (2014) pp. 315-321.
- [211] B. Peers, J. Leonard, S. Sharma, G. Teitelman, M.R. Montminy, Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) pp. 1798-1806.
- [212] L. Peltonen, M. Perola, J. Naukkarinen, A. Palotie, Lessons from studying monogenic disease for common disease, *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No 1 (2006) p.R67-R74.
- [213] B. Perez-Villamil, P.T. Schwartz, M. Vallejo, The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development, *Endocrinology* 140 (1999) pp. 3857-3860.
- [214] M.A. Permutt and D.M. Kipnis, Insulin biosynthesis: studies of Islet polyribosomes (nascent peptides-sucrose gradient analysis-gel filtration), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69 (1972) pp. 505-509.
- [215] H.V. Petersen, M. Peshavaria, A.A. Pedersen, J. Philippe, R. Stein, O.D. Madsen, P. Serup, Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor, *FEBS Lett.* 431 (1998) pp. 362-366.

- [216] F. Pierre, P.C. Chua, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M.K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J.P. Whitten, T.K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, W.G. Rice, D.M. Ryckman, K. Anderes, Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer, *Mol. Cell Biochem.* 356 (2011) pp. 37-43.
- [217] L.A. Pinna and F. Meggio, Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation, *Progress in Cell Cycle Research* 3 (1997) pp. 77-97.
- [218] P. Pognonec, K.E. Boulukos, C. Aperlo, M. Fujimoto, H. Ariga, A. Nomoto, H. Kato, Cross-family interaction between the bHLHZip USF and bZip Fra1 proteins results in down-regulation of AP1 activity, *Oncogene* 14 (1997) pp. 2091-2098.
- [219] L. Portois, M. Tastenoy, B. Viollet, M. Svoboda, Functional analysis of the glucose response element of the rat glucagon receptor gene in insulin-producing INS-1 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1574 (2002) pp. 175-186.
- [220] R.L. Printz, M.A. Magnuson, D.K. Granner, Mammalian glucokinase, *Annu. Rev. Nutr.* 13 (1993) pp. 463-496.
- [221] K.M. Providence, L.A. White, J. Tang, J. Gonclaves, L. Staiano-Coico, P.J. Higgins, Epithelial monolayer wounding stimulates binding of USF-1 to an E-box motif in the plasminogen activator inhibitor type 1 gene, *J. Cell Sci.* 115 (2002) pp. 3767-3777.
- [222] A. Prowald, N. Schuster, M. Montenarh, Regulation of the DNA binding activity of p53 by its interaction with protein kinase CK2, *Eur. J. Cell Biol.* 72 (1997) p.70.
- [223] A. Prowald, N. Schuster, M. Montenarh, Regulation of the DNA binding of p53 by its interaction with protein kinase CK2, *FEBS Letters* 408 (1997) pp. 99-104.
- [224] J. Qian, E.N. Kaytor, H.C. Towle, L.K. Olson, Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells, *Biochem. J.* 341 (1999) pp. 315-322.

- [225] Y. Qiu, M. Guo, S. Huang, R. Stein, Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) pp. 412-420.
- [226] C. Queiroz-Claret, P. Jolivet, T. Chardot, E. Bergeron, J.C. Meunier, Time-coordinated control of glycogen synthase, protein phosphatase 2A and protein kinase CK2 during culture growth in *Yarrowia lipolytica* in relation to glycogen metabolism, *C. R. Acad. Sci. III* 323 (2000) pp. 257-266.
- [227] Y. Qyang, X. Luo, T. Lu, P.M. Ismail, D. Krylov, C. Vinson, M. Sawadogo, Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) pp. 1508-1517.
- [228] M.L. Read, A.R. Clark, K. Docherty, The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer, *Biochem. J.* 295 (1993) pp. 233-237.
- [229] A.P. Reiner, C.S. Carlson, N.S. Jenny, J.P. Durda, D.S. Siscovick, D.A. Nickerson, R.P. Tracy, USF1 gene variants, cardiovascular risk, and mortality in European Americans: analysis of two US cohort studies, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) pp. 2736-2742.
- [230] M.A. Renault, S. Jalvy, M. Potier, I. Belloc, E. Genot, L.V. Dekker, C. Desgranges, A.P. Gadeau, UTP induces osteopontin expression through a coordinate action of NFkappaB, activator protein-1, and upstream stimulatory factor in arterial smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) pp. 2708-2713.
- [231] E. Roche, F. Assimacopoulos-Jeannet, L.A. Witters, B. Perruchoud, G. Yaney, B. Corkey, M. Asfari, M. Prentki, Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1), *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 3091-3098.
- [232] P.V. Roder, B. Wu, Y. Liu, W. Han, Pancreatic regulation of glucose homeostasis, *Exp. Mol. Med.* 48 (2016) p.e219.

- [233] C.I. Rodriguez, N. Girones, M. Fresno, Cha, a basic helix-loop-helix transcription factor involved in the regulation of upstream stimulatory factor activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 43135-43145.
- [234] M. Rossi, d.A. Ruiz, I. L.F. Barella, W. Sakamoto, L. Zhu, Y. Cui, H. Lu, H. Rebholz, F.M. Matschinsky, N.M. Doliba, A.J. Butcher, A.B. Tobin, J. Wess, CK2 acts as a potent negative regulator of receptor-mediated insulin release in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 112 (2015) p.E6818-E6824.
- [235] A. Rudnick, T.Y. Ling, H. Odagiri, W.J. Rutter, M.S. German, Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91 (1994) pp. 12203-12207.
- [236] R.K. Saiki, C.A. Chang, C.H. Levenson, T.C. Warren, C.D. Boehm, H.H. Kazazian, Jr., H.A. Erlich, Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes, *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) pp. 537-541.
- [237] E. Salero, C. Gimenez, F. Zafra, Identification of a non-canonical E-box motif as a regulatory element in the proximal promoter region of the apolipoprotein E gene, *Biochem. J.* 370 (2003) pp. 979-986.
- [238] A. Samoylenko, E.Y. Dimova, T. Horbach, N. Teplyuk, S. Immenschuh, T. Kietzmann, Opposite expression of the antioxidant heme oxygenase-1 in primary cells and tumor cells: regulation by interaction of USF-2 and Fra-1, *Antioxid. Redox. Signal.* 10 (2008) pp. 1163-1174.
- [239] A. Samoylenko, U. Roth, K. Jungermann, T. Kietzmann, The upstream stimulatory factor-2a inhibits plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by binding to a promoter element adjacent to the hypoxia-inducible factor-1 binding site, *Blood* 97 (2001) pp. 2657-2666.
- [240] A.P. Sanchez, J. Zhao, Y. You, A.E. Decleves, M. Diamond-Stanic, K. Sharma, Role of the USF1 transcription factor in diabetic kidney disease, *Am. J. Physiol Renal Physiol* 301 (2011) p.F271-F279.

- [241] M. Sander, S.C. Griffen, J. Huang, M.S. German, A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) pp. 11572-11577.
- [242] S. Sarno, E. Papinutto, C. Franchin, J. Bain, M. Elliott, F. Meggio, Z. Kazimierczuk, A. Orzeszko, G. Zanotti, R. Battistutta, L.A. Pinna, ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) pp. 1340-1351.
- [243] M. Sato, Y. Fukushi, S. Ishizawa, S. Okinaga, R.M. Muller, S. Shibahara, Transcriptional control of the rat heme oxygenase gene by a nuclear protein that interacts with adenovirus 2 major late promoter, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) pp. 10251-10260.
- [244] M. Sato, S. Ishizawa, T. Yoshida, S. Shibahara, Interaction of upstream stimulatory factor with the human heme oxygenase gene promoter, *Eur. J. Biochem.* 188 (1990) pp. 231-237.
- [245] M. Sawadogo, Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) pp. 11994-12001.
- [246] M. Sawadogo and R.G. Roeder, Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region, *Cell* 43 (1985) pp. 165-175.
- [247] M. Sawadogo, M.W. Van Dyke, P.D. Gregor, R.G. Roeder, Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) pp. 11985-11993.
- [248] K. Sayasith, J.G. Lussier, J. Sirois, Role of upstream stimulatory factor phosphorylation in the regulation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in granulosa cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) pp. 28885-28893.
- [249] A. Schnitzler, B.B. Olsen, O.G. Issinger, K. Niefind, The protein kinase CK2(Andante) holoenzyme structure supports proposed models of

- autoregulation and trans-autophosphorylation, *J. Mol. Biol.* 426 (2014) pp. 1871-1882.
- [250] A.C. Schrimpe-Rutledge, G. Fontes, M.A. Gritsenko, A.D. Norbeck, D.J. Anderson, K.M. Waters, J.N. Adkins, R.D. Smith, V. Poitout, T.O. Metz, Discovery of novel glucose-regulated proteins in isolated human pancreatic islets using LC-MS/MS-based proteomics, *J. Proteome. Res.* 11 (2012) pp. 3520-3532.
- [251] N. Schuster, C. Götz, M. Faust, E. Schneider, A. Prowald, A. Jungbluth, M. Montenarh, Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity, *J. Cell. Biochem.* 81 (2001) pp. 172-181.
- [252] N. Schuster, A. Prowald, E. Schneider, K.-H. Scheidtmann, M. Montenarh, Regulation of p53 mediated transactivation by the β -subunit of protein kinase CK2, *FEBS Lett.* 447 (1999) pp. 160-166.
- [253] L. Schwind, N. Wilhelm, S. Kartarius, M. Montenarh, E. Gorjup, C. Götz, Protein kinase CK2 is necessary for the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Acta* 1853 (2014) pp. 2207-2216.
- [254] L. Schwind, A. Zimmer, C. Götz, M. Montenarh, CK2 phosphorylation of C/EBP δ regulates its transcription factor activity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 61 (2015) pp. 81-89.
- [255] W.G. Seetoh, D.S. Chan, D. Matak-Vinkovic, C. Abell, Mass Spectrometry Reveals Protein Kinase CK2 High-Order Oligomerization via the Circular and Linear Assembly, *ACS Chem. Biol.* im Druck (2016).
- [256] P. Serup, H.V. Petersen, E.E. Pedersen, H. Edlund, J. Leonard, J.S. Petersen, L.I. Larsson, O.D. Madsen, The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site, *Biochem. J.* 310 (1995) pp. 997-1003.
- [257] S. Shao, Z. Fang, X. Yu, M. Zhang, Transcription factors involved in glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009) pp. 401-404.

- [258] A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel, Jr., Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) pp. 815-820.
- [259] S. Sharma, U.S. Jhala, T. Johnson, K. Ferreri, J. Leonard, M. Montminy, Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) pp. 2598-2604.
- [260] S. Sharma, J. Leonard, S. Lee, H.D. Chapman, E.H. Leiter, M.R. Montminy, Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 2294-2299.
- [261] L. Shi, S. Liu, D. Nikolic, S. Wang, High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells, *J. Cell Biochem.* 103 (2008) pp. 1952-1961.
- [262] N. Shibata, T. Ohnuma, S. Higashi, M. Higashi, C. Usui, T. Ohkubo, T. Watanabe, R. Kawashima, A. Kitajima, A. Ueki, M. Nagao, H. Arai, Genetic association between USF 1 and USF 2 gene polymorphisms and Japanese Alzheimer's disease, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61 (2006) pp. 660-662.
- [263] H. Shih and H.C. Towle, Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) pp. 9380-9387.
- [264] H.M. Shih and H.C. Towle, Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) pp. 13222-13228.
- [265] C.C. Shoulders and R.P. Naoumova, USF1 implicated in the aetiology of familial combined hyperlipidaemia and the metabolic syndrome, *Trends Mol. Med.* 10 (2004) pp. 362-365.
- [266] A. Siddiqui-Jain, D. Drygin, N. Streiner, P. Chua, F. Pierre, S.E. O'Brien, J. Bliesath, M. Omori, N. Huser, C. Ho, C. Proffitt, M.K. Schwaebe, D.M. Ryckman, W.G. Rice, K. Anderes, CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy, *Cancer Res.* 70 (2010) pp. 10288-10298.

- [267] M. Sirito, Q. Lin, J.M. Deng, R.R. Behringer, M. Sawadogo, Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) pp. 3758-3763.
- [268] M. Sirito, Q. Lin, T. Maity, M. Sawadogo, Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) pp. 427-433.
- [269] M. Sirito, S. Walker, Q. Lin, M.T. Kozlowski, W.H. Klein, M. Sawadogo, Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers, *Gene Expr.* 2 (1992) pp. 231-240.
- [270] J.W. Slaton, G.M. Unger, D.T. Sloper, A.T. Davis, K. Ahmed, Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model, *Cell Growth Differ.* 2 (2004) pp. 712-721.
- [271] G.C. Smith and S.P. Jackson, The DNA-dependent protein kinase, *Genes Dev.* 13 (1999) pp. 916-934.
- [272] J. Sommercorn, J.A. Mulligan, F.J. Lozeman, E. Krebs, Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) pp. 8834-8838.
- [273] S. Spohrer, E.Y. Dimova, T. Kietzmann, M. Montenarh, C. Götz, The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA, *Cell Signal.* 28 (2016) pp. 23-31.
- [274] S.K. Sreenan, B.N. Cockburn, A.C. Baldwin, D.M. Ostrega, M. Levisetti, A. Grupe, G.I. Bell, T.A. Stewart, M.W. Roe, K.S. Polonsky, Adaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice, *Diabetes* 47 (1998) pp. 1881-1888.
- [275] G. Stalter, S. Siemer, E. Becht, M. Ziegler, K. Remberger, O.-G. Issinger, Asymmetric expression of protein kinase CK2 in human kidney tumors., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) pp. 141-147.

- [276] J. Stigare, N. Buddelmeijer, A. Pigon, E. Egyhazi, A majority of CK2 alpha subunit is tightly bound to intranuclear compounds but not to the beta subunit., *Mol. Cell. Biol.* 129 (1993) pp. 77-85.
- [277] M. Stoffel, P. Froguel, J. Takeda, H. Zouali, N. Vionnet, S. Nishi, I.T. Weber, R.W. Harrison, S.J. Pilgis, S. Lesage, ., Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (1992) pp. 7698-7702.
- [278] D.A. Stoffers, J. Ferrer, W.L. Clarke, J.F. Habener, Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1, *Nat. Genet.* 17 (1997) pp. 138-139.
- [279] D.A. Stoffers, R.S. Heller, C.P. Miller, J.F. Habener, Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter, *Endocrinology* 140 (1999) pp. 5374-5381.
- [280] D.A. Stoffers, M.K. Thomas, J.F. Habener, Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression, *Trends Endocrinol. Metab* 8 (1997) pp. 145-151.
- [281] H.S. Sul, C.M. Smas, D. Wang, L. Chen, Regulation of fat synthesis and adipose differentiation, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 60 (1998) pp. 317-345.
- [282] Y. Tanaka, C.E. Gleason, P.O. Tran, J.S. Harmon, R.P. Robertson, Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999) pp. 10857-10862.
- [283] M.J. Tanasijevic, M.G. Myers, Jr., R.S. Thoma, D.L. Crimmins, M.F. White, D.B. Sacks, Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) pp. 18157-18166.
- [284] L. Tappy, P. Dussoix, P. Iynedjian, S. Henry, P. Schneiter, G. Zahnd, E. Jequier, J. Philippe, Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene, *Diabetes* 46 (1997) pp. 204-208.

- [285] J. Terragni, G. Nayak, S. Banerjee, J.L. Medrano, J.R. Graham, J.F. Brennan, S. Sepulveda, G.M. Cooper, The E-box binding factors Max/Mnt, MITF, and USF1 act coordinately with FoxO to regulate expression of proapoptotic and cell cycle control genes by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 signaling, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) pp. 36215-36227.
- [286] L.H. Thompson and M.G. West, XRCC1 keeps DNA from getting stranded, *Mutat. Res.* 459 (2000) pp. 1-18.
- [287] H.C. Towle, E.N. Kaytor, H.M. Shih, Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate, *Annu. Rev. Nutr.* 17 (1997) pp. 405-433.
- [288] M.T. Travers, A.J. Vallance, H.T. Gourlay, C.A. Gill, I. Klein, C.B. Bottema, M.C. Barber, Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- α gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes, *Biochem. J.* 359 (2001) pp. 273-284.
- [289] P.T. Tuazon and J.A. Traugh, Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation, *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 23 (1991) pp. 123-164.
- [290] M. Ubeda and J.F. Habener, CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 40514-40520.
- [291] G.M. Unger, A.T. Davis, J.W. Slaton, K. Ahmed, Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy, *Curr. Cancer Drug Targets.* (2004) pp. 77-84.
- [292] E. Valero, S. De Bonis, O. Filhol, R.H. Wade, J. Langowski, E.M. Chambaz, C. Cochet, Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) pp. 8345-8352.
- [293] V.S. Vallet, M. Casado, A.A. Henrion, D. Bucchini, M. Raymondjean, A. Kahn, S. Vaulont, Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the

- transcriptional response of liver genes to glucose, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) pp. 20175-20179.
- [294] V.S. Vallet, A.A. Henrion, D. Bucchini, M. Casado, M. Raymondjean, A. Kahn, S. Vaulont, Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 $-/-$ mice, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 21944-21949.
- [295] M.M. van Greevenbroek, Sensors and switches in lipid and glucose metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 18 (2007) pp. 607-609.
- [296] D.D. van, H. Jansen, A.J. Verhoeven, Glucose increases hepatic lipase expression in HepG2 liver cells through upregulation of upstream stimulatory factors 1 and 2, *Diabetologia* 51 (2008) pp. 2078-2087.
- [297] D.D. van, L.M. Van, S. Vaulont, H. Jansen, A.J. Verhoeven, Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 activate the human hepatic lipase promoter via E-box dependent and independent mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) pp. 229-237.
- [298] S. Vaulont, M. Vasseur-Cognet, A. Kahn, Glucose regulation of gene transcription, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 31555-31558.
- [299] A. Verger, J. Perdomo, M. Crossley, Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation, *EMBO Rep.* 4 (2003) pp. 137-142.
- [300] B. Viollet, A.M. Lefrancois-Martinez, A. Henrion, A. Kahn, M. Raymondjean, A. Martinez, Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 1405-1415.
- [301] N.P. Visavadiya, Y. Li, S. Wang, High glucose upregulates upstream stimulatory factor 2 in human renal proximal tubular cells through angiotensin II-dependent activation of CREB, *Nephron Exp. Nephrol.* 117 (2011) p.e62-e70.
- [302] G. Waeber, N. Thompson, P. Nicod, C. Bonny, Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) pp. 1327-1334.

- [303] M.D. Walker, T. Edlund, A.M. Boulet, W.J. Rutter, Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes, *Nature* 306 (1983) pp. 557-561.
- [304] D. Wang and H.S. Sul, Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) pp. 28716-28722.
- [305] D. Wang and H.S. Sul, Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 26367-26374.
- [306] H. Wang and C.B. Wollheim, ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 32746-32752.
- [307] S. Wang, Role of upstream stimulatory factor 2 in diabetic nephropathy, *Front Biol. (Beijing)* 10 (2015) pp. 221-229.
- [308] T. Wang, T.S. Furey, J.J. Connelly, S. Ji, S. Nelson, S. Heber, S.G. Gregory, E.R. Hauser, A general integrative genomic feature transcription factor binding site prediction method applied to analysis of USF1 binding in cardiovascular disease, *Hum. Genomics* 3 (2009) pp. 221-235.
- [309] Y. Wang, J. Viscarra, S.J. Kim, H.S. Sul, Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) pp. 678-689.
- [310] H. Watada, Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, Y. Yamasaki, The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells, *Diabetes* 45 (1996) pp. 1478-1488.
- [311] M. Watford, Tissue-specific regulation of glucokinase, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) pp. 1-2.
- [312] C. Weigert, K. Brodbeck, M. Sawadogo, H.U. Haring, E.D. Schleicher, Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of

- USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) pp. 15908-15915.
- [313] S. Welker, Diplomarbeit "Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase CK2 und dem Transkriptionsfaktor PDX-1 - Neue Ansätze zur Regulation des Insulinmetabolismus und der Glucosehomöostase", 2011.
- [314] S. Welker, C. Götz, C. Servas, M.W. Laschke, M.D. Menger, M. Montenarh, Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic β -cells and its interaction with PDX-1., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) pp. 2786-2795.
- [315] J. Whelan, S.R. Cordle, E. Henderson, P.A. Weil, R. Stein, Identification of a pancreatic beta-cell insulin gene transcription factor that binds to and appears to activate cell-type-specific expression: its possible relationship to other cellular factors that bind to a common insulin gene sequence, *Mol. Cell Biol.* 10 (1990) pp. 1564-1572.
- [316] L.A. White, C. Bruzdinski, S.M. Kutz, T.D. Gelehrter, P.J. Higgins, Growth state-dependent binding of USF-1 to a proximal promoter E box element in the rat plasminogen activator inhibitor type 1 gene, *Exp. Cell Res.* 260 (2000) pp. 127-135.
- [317] A.J. Whitmarsh and R.J. Davis, Regulation of transcription factor function by phosphorylation, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) pp. 1172-1183.
- [318] A.J. Whitmarsh and R.J. Davis, Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer, *Oncogene* 26 (2007) pp. 3172-3184.
- [319] R.H. Wong, I. Chang, C.S. Hudak, S. Hyun, H.Y. Kwan, H.S. Sul, A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin, *Cell* 136 (2009) pp. 1056-1072.
- [320] R.H. Wong and H.S. Sul, DNA-PK: relaying the insulin signal to USF in lipogenesis, *Cell Cycle* 8 (2009) pp. 1977-1978.
- [321] Q. Xiao, A. Kenessey, K. Ojamaa, Role of USF1 phosphorylation on cardiac α -myosin heavy chain promoter activity, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 283 (2002) p.H213-H219.

- [322] X. Xu, P.A. Toselli, L.D. Russell, D.C. Seldin, Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit, *Nature Genet.* 23 (1999) pp. 118-121.
- [323] S.H. Yu, H.M. Wang, A. Davis, K. Ahmed, Consequences of CK2 signaling to the nuclear matrix, *Mol. Cell. Biochem.* 227 (2001) pp. 67-71.
- [324] E. Zeggini, C.M. Damcott, R.L. Hanson, M.A. Karim, N.W. Rayner, C.J. Groves, L.J. Baier, T.C. Hale, A.T. Hattersley, G.A. Hitman, S.E. Hunt, W.C. Knowler, B.D. Mitchell, M.C. Ng, J.R. O'Connell, T.I. Pollin, M. Vaxillaire, M. Walker, X. Wang, P. Whittaker, K. Xiang, W. Jia, J.C. Chan, P. Froguel, P. Deloukas, A.R. Shuldiner, S.C. Elbein, M.I. McCarthy, Variation within the gene encoding the upstream stimulatory factor 1 does not influence susceptibility to type 2 diabetes in samples from populations with replicated evidence of linkage to chromosome 1q, *Diabetes* 55 (2006) pp. 2541-2548.
- [325] A.S. Zervos, J. Gyuris, R. Brent, Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites, *Cell* 72 (1993) pp. 223-232.
- [326] S. Zhang and K.H. Kim, Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene, *Arch. Biochem. Biophys.* 338 (1997) pp. 227-232.
- [327] L. Zhao, M. Guo, T.A. Matsuoka, D.K. Hagman, S.D. Parazzoli, V. Poitout, R. Stein, The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) pp. 11887-11894.
- [328] Y. Zhu, M. Casado, S. Vaulont, K. Sharma, Role of upstream stimulatory factors in regulation of renal transforming growth factor-beta1, *Diabetes* 54 (2005) pp. 1976-1984.

9. Publikationen

Lupp S, Gumhold C, Ampofo E, Montenarh M, Rother K. CK2 kinase activity but not its binding to CK2 promoter regions is implicated in the regulation of CK2 α and CK2 β gene expressions. *Mol Cell Biochem.* 2013 Dec;384(1-2):71-82. doi: 10.1007/s11010-013-1782-8. Epub 2013 Aug 21.

Lupp S, Götz C, Khadouma S, Horbach T, Dimova EY, Bohrer AM, Kietzmann T, Montenarh M. The upstream stimulatory factor USF1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation. *Cell Signal.* 2014 Dec;26(12):2809-17. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.08.028. Epub 2014 Sep 4.

Lupp S, Götz C und Montenarh M. Die Proteinkinase CK2 reguliert die Heterodimerisierung und Transaktivierungsfähigkeit der USF-Proteine. Kolloquiumsband der Graduiertenförderung der Hochschulen des Saarlandes 2015. Urn:nbn:de:bsz:291-scidok-59899.

Spohrer S, Dimova EY, Kietzmann T, Montenarh M, Götz C. The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA. *Cell Signal.* 2015 Nov 11;28(2):23-31. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.007.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Montenarh für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragestellungen, sowie der Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Durch ihn bekam ich die Möglichkeit selbstständig wissenschaftlich arbeiten zu lernen, eigene Ideen zu entwickeln und diese in meine Arbeit einbringen zu können. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Grässer bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Zweitberichterstattung und das damit verbundene Interesse an meiner Arbeit.

Ein besonders großes Dankeschön gilt auch Frau Prof. Dr. C. Götz, die auch in so manchen schweren Zeiten an meine Arbeit geglaubt hat und mich immer wieder neu motiviert hat. Ich danke Ihr dafür, dass Sie stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand!

Ein weiterer großer Dank gilt natürlich der Graduiertenförderung der Universität des Saarlandes (GradUS), die mich mit einem Stipendium die letzten Jahre finanziell unterstützt hat. Dabei ist Dr. Theo Jäger besonders zu erwähnen, der sich mit besonderer Hingabe um alle Stipendiaten kümmert und als Ansprechpartner hilft wo er kann.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Emmanuel Ampofo vom Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg für die Bereitstellung der Gewebeproben bedanken und für seine Hilfestellung bei Problemen jeglicher Art.

Ein aufrichtiger Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Vor allem bei Heike Stumpf bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung bei Laborarbeiten jeglicher Art.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen Lisa Schwind, Sabrina Klein und Catalina Sawatzki danke ich für ihre Freundschaft und die vielen humorvollen Momente, die die Laborarbeit jeden Tag verschönern haben. Ich bin sehr froh, auch über den Laboralltag hinaus, so gute Freunde gefunden zu haben!

Nicht zuletzt gilt ein besonderes Dankeschön meiner Familie und meinem Mann, die mich jederzeit unterstützten und mich mit viel Verständnis durch Studium und Promotion begleitet haben. Es war bestimmt nicht immer leicht mit mir und gerade deshalb möchte ich mich bei Ihnen für ihre Geduld mit mir herzlich bedanken!